Strukturelle und biochemische Untersuchungen an der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms Lumbricus terrestris L.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Angela Ditgens
aus Remscheid

Düsseldorf 1983

Strukturelle und biochemische Untersuchungen an der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms Lumbricus terrestris L.

Inaugural - Dissertation
zur Erlangung des Doktorgrades
der
Mathematisch-Naturwissenschaftlichen Fakultät
der Universität Düsseldorf

vorgelegt von

Angela Ditgens
aus Remscheid

Düsseldorf 1983

UNIV.
LEIDEN
BIBL.

1. Berichterstatter: Prof. Dr. W. Peters

2. Berichterstatter: Prof. Dr. K.- D. Spindler

Tag der mündlichen Prüfung: 14. Juli 1983

Inhaltsverzeichnis

		Seite
I.	Einleitung	1
II.	Material und Methoden	8
1.	Herstellung und Untersuchung von Einzelzellen des Regenwurm-Hautmuskelschlauchs	8
1.1	Isolierung und Glycerinierung der Zellen	8
1.2	Kontraktionsexperimente	9
2.	Präparation der Muskelproteine	10
2.1	Präparation kontraktiler Ptoteine der Regenwurmmuskulatur	10
2.1.1	Präparation nativer Actin-Filamente	11
2.1.2	Präparation von Tropomyosin-Troponin	12
2.1.3	Präparation von Actomyosin, Actin-angereichertem Actomyosin und Myosin	13
2.1.4	Präparation von Tropomyosin und Troponin	14
2.2	Präparation kontraktiler Proteine der Kaninchen-Skelettmuskulatur	16
3.	Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden	16
4.	Analytische Methoden	17
4.1	Protein- und ATPase-Aktivitäts-bestimmung	17
4.2	SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)	18
4.3	Zwei-dimensionale Elektrophorese	19
4.4	Gelfiltration von Tropomyosin	21

Seite

III.	Ergebnisse	22
1.	Strukturelle Untersuchungen der schräggestreiften Muskulatur	22
1.1	Untersuchungen an isolierten Muskelzellen	22
1.2	Untersuchungen an glycerinierten Muskelzellen	30
2.	Das Actomyosin-System	38
2.1	Isolierung und allgemeine Eigenschaften	38
2.2	Untersuchungen zur Ca-Regulation des Actomyosins	44
2.2.1	Die Ca-Abhängigkeit des Actomyosins	44
2.2.2	Indirekter Nachweis dualer Regulation	45
2.2.3	Direkter Nachweis dualer Regulation	47
2.2.4	Untersuchungen zur Ca-Abhängigkeit der Actin- und Myosin-gekoppelten Regulation	50
3.	Charakterisierung von Tropomyosin	55
3.1	Isolierung und allgemeine Eigenschaften	55
3.2	Strukturelle Eigenschaften von Tropomyosin	65
3.3	Funktionelle Eigenschaften von Tropomyosin	70
3.3.1	Bindung von Tropomyosin an F-Actin des Skelettmuskels	71
3.3.2	Ca-unabhängige Effekte von Tropomyosin auf die Actomyosin-ATPase-Aktivität	74
3.3.3	Die Wirkung von Tropomyosin im Ca-sensitiven Acto-HMM-System des Skelettmuskels	79
4.	Der am Actin lokalisierte Komplex regulatorischer Proteine	82
4.1	Die Fixierung der Actin-Filamente	82
4.2	Isolierung der regulatorischen Proteine	84
4.3	Wirkung von Regenwurm-Tropomyosin-Troponin im Acto-HMM-System des Skelettmuskels	86

Seite

4.4 Bindungseigenschaften der regulatorischen Proteine und ihre Wirkung im desensibilisierten Actomyosin des Regenwurms 87

4.5 Isolierung einer Troponin-ähnlichen Fraktion 92

4.6 Rekonstitution eines Tropomyosin-Troponin-Komplexes 93

4.7 Versuch der Auftrennung des Troponins in seine Untereinheiten 94

4.8 Identifizierung der isolierten Troponin-Untereinheiten 96

IV. Diskussion 99

V. Zusammenfassung 145

VI. Verzeichnis der Abkürzungen 147

VII. Literaturverzeichnis 148

Digitized by the Internet Archive
in 2026

https://archive.org/details/IA41543914_0039

I. Einleitung

Bei sämtlichen, in tierischen und pflanzlichen Organismen stattfindenden aktiven Prozessen, die mit Kontraktions- und Bewegungsvorgängen unterschiedlichster Art verbunden sind, wurde bisher eine Umwandlung von chemischer in mechanische Energie festgestellt. Es hat sich gezeigt, daß die chemische Energie fast immer im Form von Adenosintriphosphat (ATP) bereitgestellt wird. Dieses wird durch die Actin-aktivierte Myosin-ATPase gespalten, wobei es durch die zyklische Interaktion der beiden Proteine Actin und Myosin zur Kraftentfaltung kommt. Diese beruht nach heutigen Vorstellungen auf reversiblen Konformationsänderungen. Actin und Myosin bilden in Form von filamentösen Aggregaten ein Gerüst, welches bezüglich seines Ordnungsgrades eine beträchtliche Variabilität aufweist. Je nach den funktionellen Anforderungen, die an das jeweilige System gestellt werden, treten unterschiedliche Organisationstypen auf; diese reichen von den relativ instabilen Actomyosin-Netzwerken der Nicht-Muskelzellen bis hin zu den hochgeordneten Formen der quergestreiften Muskulatur von Arthropoden und Chordaten.

Die Muskulatur der Wirbeltiere wird gewöhnlich in zwei Muskeltypen unterteilt, einen quergestreiften und einen glatten. Neben diesen wurde bei den Wirbellosen zusätzlich eine Sorte von Muskeln beschrieben, welche als helikal oder schräggestreift bezeichnet werden. Schon vor mehr als 100 Jahren wurden Muskelzellen dieses Typs als stark abweichend von den bekannten Wirbeltiermuskelzellen dargestellt. So berichtete Schwalbe 1869: "Bei genauerer Betrachtung solcher Fasern wird man bald auf Liniensysteme aufmerksam, die nicht etwa quer um die Muskelfaser herum oder der Länge nach verlaufen und somit eine Quer- oder Längsstreifung darstellen, sondern die vielmehr schräg von einer Seite der Faser zur anderen hinüberziehen. Es hat den Anschein, als ob zwei sich kreuzende Systeme von

Spiralfasern um den Muskelcylinder herumliefen." Das durch die gegenläufige Musterung von Vorder- und Rückseite der Zellen entstandene Bild wurde von Schwalbe erstmals als doppelte Schrägstreifung bezeichnet. Er vermutete, daß die innerhalb des Kreuzungsmusters sichtbaren rhombischen Flächen das kontraktile Material darstellten. 1881 wußte Engelmann die Beobachtungen Schwalbes richtig zu deuten. Er erkannte, daß die beschriebenen Linien als Fibrillen angesehen werden müssen, in denen allein der "Sitz der Contractilität" zu sehen sei. Weiterhin machte er die wichtige Feststellung, daß der Winkel der Fibrillen zur Längsachse der Zelle direkt mit dem Kontraktionszustand derselben korrelliert.

Die Bezeichnung der schrägverlaufenden Linien als Fibrillen ist bei den hier folgenden Darstellungen beibehalten. Auf die notwendige Abgrenzung zu den Fibrillen des quergestreiften Skelettmuskels wird später noch eingegangen werden.

Der Typ des schräggestreiften Muskels wurde ausführlicher bisher bei Nemathelminthen, Anneliden und Mollusken beschrieben (s. a. Lanzavecchia, 1977), ist aber wahrscheinlich auch noch bei anderen Tierstämmen vertreten, wie Echinodermen (Schwalbe, 1869), Plathelminthen (Lanzavecchia, 1977) und Tentaculaten (Bouligand, 1966).

Die strukturelle Grundlage der Schrägstreifung konnte erst durch genauere Kenntnis vom Aufbau der kontraktilen Elemente verstanden werden. Bis dahin wurde der schräggestreifte Muskel noch als Variante des glatten Muskels angesehen (Hanson & Lowy, 1957). Elektronenmikroskopische Untersuchungen durch Rosenbluth (1965, 1967, 1968), Heumann & Zebe (1967), Mill & Knapp (1970) und Knapp & Mill (1971) etablierten den schräggestreiften Muskel als eigenen Organisationstyp.

Wie im quergestreiften Muskel sind die Actin- und Myosin-Filamente des schräggestreiften Muskels innerhalb von Sarkomeren angeordnet. Der grundlegende Unterschied zwischen den beiden Muskeltypen besteht in der räumlichen Ausdehnung der einzelnen Sarkomere und ihrer Anordnung. Im Skelettmuskel werden die kontraktilen Einheiten durch Z-Scheiben begrenzt; was den Sarkomeren eine zylindrische, dreidimensionale Form gibt. Die Z-Elemente des schräggestreiften Muskels sind stabförmig, woraus flache, eher zweidimensionale Sarkomere resultieren. Dadurch, daß die einzelnen Filamentlagen in Faserlängsrichtung gegeneinander versetzt sind, verlaufen A- und I-Banden diagonal, was den Eindruck einer Schrägstreifung entstehen läßt (Abb. 1). Die Schrägstreifen verlaufen beim erschlafften Muskel in einem Winkel von 5° zur Faserlängsachse. Beim kontrahierten Muskel beträgt dieser Winkel etwa 30° (Hanson, 1957).

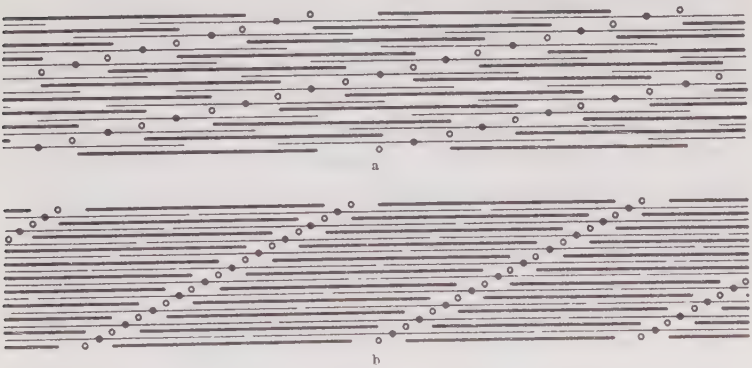


Abb. 1: Schematische Darstellung von Längsschnitten entlang der Flachseite (xz-Ebene; s.S. 25) einer erschlafften (a) und einer kontrahierten (b) Zelle schräggestreifter Muskulatur. Die ausgefüllten und offenen Punkte stellen die Z-Stäbe bzw. Tubuli des Sarkoplasmatischen Retikulums dar. Die dicken und dünnen Linien deuten Myosin- bzw. Actin-Filamente an (aus Heumann & Zebe, 1967).

Aufgrund welcher molekularen Vorgänge die Verkürzung des schräggestreiften Muskels erfolgt, ist noch nicht eindeutig geklärt. Für die Kontraktion des quergestreiften Skelettmuskels ist die Gleithypothese der Filamente (Huxley & Niedergerke, 1954; zusf. Darst. Huxley, 1972) allgemein anerkannt. Danach erfolgt die Kontraktion des Muskels durch Verkürzung der Sarkomere unter Konstanthaltung der Filamentlängen, wobei die Actin-Filamente durch die Kraftentwicklung von Querbrücken in Form von Myosinköpfen in die Myosin-Filamentlagen hineingezogen werden. Für den schräggestreiften Muskel gilt es als wahrscheinlich, daß neben einer derartigen Sarkomerverkürzung zusätzlich ein zweiter Kontraktionsmechanismus wirksam ist (Rosenbluth, 1967; Heumann & Zebe, 1967). Dieser beinhaltet die Verschiebung der gestaffelt übereinanderliegenden Sarkomere, bzw. Myosin-Filamentlagen gegeneinander. Mit diesem auch als "Scheren" der Myosin-Filamente bezeichneten Prozeß wäre eine Verkürzung des Muskels verbunden, die nicht auf der Verkürzung der Sarkomere beruht. Die Änderung des Winkels der Schrägstellung zur Faserlängsachse von 5° auf 30° wäre ebenfalls hierdurch zu erklären.

Die zu Beginn der vorliegenden Arbeit dargestellten Versuche an isolieren Zellen der Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* sollen einen Beitrag zum Verständnis der Zusammenhänge zwischen Struktur und Funktion bei diesem Muskeltyp leisten.

Unabhängig vom Kontraktionsmechanismus eines Muskels ist seine Aktivität nur in Anwesenheit geringer Mengen an Ca möglich. Die Ca-Abhängigkeit der Muskelkontraktion wurde bereits 1913 von Mines erkannt. Später zeigten Bozler (1954) und Watanabe (1955), daß durch Ca-Entzug die Erschlaffung von glycerinierten Muskelfasern hervorgerufen werden kann, und Weber & Herz (1963) beobachteten, daß Homogenate von Myofibrillen nur in Anwesenheit von Ca volle ATPase-Aktivität zeigten.

Die Unterschiede in der Ca-Konzentration werden durch Membransysteme erzeugt, die in der Lage sind, aktiv Ca zu akkumulieren und es auf nervösen Reiz hin ins Cytoplasma auszuschütten. Im Skelettmuskel sind diese Membranstrukturen als Sarkoplasmatisches Retikulum bekannt, und in einigen schräggestreiften Muskeln wirbelloser Tiere wurden diesem entsprechende Membransysteme nachgewiesen (Rosenbluth, 1965, 1968; Heumann & Zebe, 1967). Die Veränderungen der Ca-Konzentration wirken auf regulatorische Proteine, die das Ca-Signal auf das Actomyosin-System übertragen.

Eine Vielzahl von Arbeiten über die Regulation der Kontraktion des quergestreiften Skelettmuskels führte zu genaueren Vorstellungen über die Funktion der regulatorischen Proteine dieses Muskeltyps (zusf. Darst. Ebashi & Endo, 1968; Weber & Murray, 1973; Mannherz & Goody, 1976; Perry, 1979). Als Modell zum Verständnis des Regulationsmechanismus ist die Theorie der sterischen Hemmung (Haselgrove, 1972; Huxley, 1972) weithin anerkannt. Eine Änderung der Ca-Konzentration von 10^{-7} M im Ruhestand auf 10^{-5} M nach Reizung führt zur Bindung von Ca an Troponin, einen am Tropomyosin lokalisierten globulären Proteinkomplex. Dies verursacht eine Konformationsänderung des gesamten Troponin-Moleküls, woraufhin das filamentöse Tropomyosin, welches sich über jeweils sieben Actin-Monomere erstreckt, seine Lage auf dem Actin-Filament ändert. Es bewegt sich von einer periphereren, distalen Stellung hin zu der Grube zwischen den beiden Actin-Strängen. Dadurch werden die vorher durch Tropomyosin blockierten Bindungsstellen für Myosin frei und es kann eine zyklische Interaktion zwischen Myosin und Actin erfolgen. Tropomyosin spielt demnach eine zentrale Rolle innerhalb des Regulationsmechanismus, indem es das Signal der Bindung von Ca an Troponin auf das gesamte Actin-Filament überträgt.

Im Gegensatz zum isolierten Actomyosin der Skelettmuskulatur von Wirbeltieren, bei welchem offensichtlich nur die am Actin lokalisierten Proteine Tropomyosin und Troponin regulatorisch aktiv sind, weisen andere Actomyosin-Systeme eine Myosin-gekoppelte Ca-Regulation auf (Lehman et al., 1972). Hierbei gelten die leichten Ketten des Myosins als regulatorisch aktive Proteinkomponenten. Sie binden entweder direkt Ca, wie es bei einigen Molluskenmuskeln der Fall ist (Szent-Györgyi et al., 1973; Kendrick-Jones, 1976) oder der Ca-Einfluß wirkt indirekt über ein Ca-sensitives Kinase-Phosphatase-System auf die Phosphorylierung einer leichten Kette, was für verschiedene glatte Vertebratenmuskeln beschrieben wurde (zusf. Darst. Small & Sobieszek, 1980; Hartshorne & Siemankowski, 1981). Welche Art von Regulation auch vorliegt, es wird bei Ca-Mangel die zyklische Interaktion von Actin und Myosin unterbrochen, sei es durch am Actin oder am Myosin lokalisierte Faktoren.

Sind in einem Muskeltyp sowohl am Actin als auch am Myosin Ca-regulatorische Proteine wirksam, so liegt duale Regulation vor. Um einen Überblick über die Verteilung der Regulationssysteme innerhalb des Tierreichs zu erhalten, wurden - vorwiegend unter Verwendung von Rohextrakten - umfangreiche Testreihen durchgeführt (Lehman & Szent-Györgyi, 1975; Lehman, 1976). Dabei stellte sich heraus - meist unter Anwendung des kompetitiven Actin- bzw. Myosin-Bindungs-Tests (Lehman & Szent-Györgyi, 1975) - daß der größte Teil der untersuchten Muskeln verschiedener Gruppen von Wirbellosen (Nematoden, Anneliden, Sipunculiden, Priapuliden, Insekten, Cheliceraten, Crustaceen) dual reguliert ist, d. h. sowohl Actin- als auch Myosin-gekoppelte Regulation zeigt. An dieser Stelle sei erwähnt, daß in den letzten Jahren wiederholt eine duale Regulation auch für den quergestreiften und glatten Wirbeltiermuskel dikutiert wurde (Lehman, 1978; Marston et al., 1980).

So stellt sich auf dem Hintergrund der weiten Verbreitung der dualen Regulation im Tierreich die Frage nach der Zweckmäßigkeit des Auftretens zweier verschiedener Regulationssysteme innerhalb eines Muskels. Ob dieses Phänomen von funktioneller Bedeutung ist, kann nur auf dem Hintergrund genauer Kenntnis der beteiligten regulatorischen Proteine beurteilt werden. Daher schien es sinnvoll, die beiden Regulationssysteme eines dual regulierten Muskels zu charakterisieren. Auch in dieser Hinsicht bot sich als Untersuchungsobjekt die schräggestreifte Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* an, welche nach den Angaben von Lehman & Szent-Györgyi (1975) dual reguliert ist. Die Autoren hatten beim Vergleich verschiedener Regulationssysteme unterschiedlicher Herkunft u.a. eine Thin-filament-Fraktion+) aus der Regenwurmmuskulatur extrahiert und vermuteten aufgrund der Ca-Bindungseigenschaften, der SDS-PAGE und der funktionellen Wirksamkeit dieser Fraktion, daß sie neben Tropomyosin auch Troponin-ähnliche Proteine enthält (Lehman et al., 1972). In der vorliegenden Arbeit wurde eine detaillierte Charakterisierung des Actin-gekoppelten Regulationssystems dieses Wirbellosenmuskels angestrebt.

Mit den im folgenden dargestellten Ergebnissen wurde versucht, zum Verständnis des schräggestreiften Muskels in mehrfacher Hinsicht beizutragen. Es wurde angestrebt, Zusammenhänge zwischen der Struktur und der Funktion dieses Muskeltyps aufzuzeigen. Weiterhin wurde sein Actomyosin-System unter besonderer Berücksichtigung der Ca-Regulation untersucht, wobei besonderer Wert auf die Frage nach den Eigenschaften der regulatorischen Proteine gelegt wurde.

+) Thin-filament-Fraktion bedeutet Fraktion nativer dünner (Actin-)Filamente, im Gegensatz zu den dicken Myosin-Filamenten.

II. Material und Methoden

1. Herstellung und Untersuchung von Einzelzellen des Regenwurm-Hautmuskelschlauchs

1.1 Isolierung und Glycerinierung der Zellen

Bei der Isolierung von Zellen aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms hatte sich gezeigt, daß Modifikationen von Methoden zur Isolierung von glatten Muskelzellen (Bagby et al., 1971; Fay & Delise, 1973; Small, 1974, 1977) die besten Erfolge brachten. Nach der Entfernung des Darms der aufgeschnittenen Regenwürmer wurden die Hautmuskelschläuche gründlich gesäubert und in 3 - 4 cm lange Stücke zerschnitten. Diese wurden auf Plexiglasstreifen aufgespannt und in einer Vorinkubationslösung (s. u.: A) drei bis zwölf Stunden auf Eis gehalten. Nachdem die Zellen durch diese Vorbehandlung in unkontrahiertem und gestrecktem Zustand vorlagen, wurde ihre Loslösung von den Bindegewebssepten durch die Einwirkung von Collagenase erreicht (Erläuterungen hierzu s.a. Kap. III. 1). Die aufgespannten Hautmuskelschlauch-Stücke wurden in Collagenase-Lösung (s.u.: B) unter Schütteln bei 30 ^{o}C inkubiert. Die abgesaugten Zellen wurden in Waschlösungen (s.u.: C) aufgenommen und in einer Heraeus-Christ Tischzentrifuge Simplex bei Stellung II durch zwei-minütige Zentrifugation sedimentiert. Dieser Waschvorgang wurde zweimal wiederholt. Bis zur weiteren Verwendung wurden die Zellen eisgekühlt aufbewahrt.

A (Vorinkubationslösung): 68 mM NaCl, 5 mM KCl, 0,33 mM Na_2HPO_4, 0,4 mM KH_2PO_4, 4 mM $NaHCO_3$, 5,5 mM Glucose, 5 mM HEPES (pH 6,1), 2 mM $MgCl_2$, 2 mM EGTA. Diese Lösung entspricht einer modifizierten Hanks' Lösung, deren Ionen-

stärke an Regenwurm-Ringer (Prosser & Zimmermann, 1943) angeglichen ist.
B (Collagenase-Lösung): 68 mM NaCl, 5 mM KCl, 4 mM $NaHCO_3$, 5 mM Glucose, 10 mM HEPES (pH 7,0), 1 mg/ml Collagenase (Sigma, Typ I).
C (Waschlösung): wie A, aber ohne EGTA.
Es wurden ähnliche Ergebnisse erzielt, wenn anstelle der Hanks' Lösung bzw. des Mediums für die Lösung der Collagenase Regenwurm-Ringer oder die in Kap. II.2 als Standard-Puffer bezeichnete Lösung verwendet wurde.

Zur Feststellung der Membrandurchlässigkeit wurde die Zellsuspension mit einigen Tropfen einer 0,5 %igen Lösung von Trypanblau versetzt.

Die Glycerinierung der Zellen erfolgte nach der Methode, die auch zur Herstellung glycerinextrahierter Skelettmuskelfasern Anwendung fand (Szent-Györgyi, 1951). Das die Zellen enthaltende Medium, meist Vorinkubationslösung (A, s. o.) oder Waschlösung (C, s. o.), wurde auf 50 - 60 %ige (Vol./Vol.) Glycerinkonzentration gebracht. Die Lagerung erfolgte bei -20 °C. Vor ihrer Verwendung wurden die Zellen zur Entglycerinierung mit Waschlösung (C, s. o.) gewaschen.

1.2 Kontraktionsexperimente

Zur lichtmikroskopischen Untersuchung der Kontraktion der Zellen wurde ein Tropfen der Zellsuspension (Zellen in Waschlösung, C, s. o.) auf einen Objektträger übertragen und mit einem Deckglas versehen. Meistens wurde Silikon-beschichtetes Glasmaterial verwendet, um ein Anhaften soweit wie möglich zu vermeiden. Die Kontraktion wurde ausgelöst, indem mit einer spitz ausgezogenen Pipette ein Tropfen Kontraktionslösung (s. u.) dicht

an den Rand des Deckglases platziert und durch Absaugen von Medium an der gegenüberliegenden Seite des Deckglases durch Filtrierpapier in Kontakt mit den Zellen gebracht wurde. Die Kontraktionslösung entsprach der Waschlösung (C, s. o.) mit zusätzlich 2 mM ATP und 1 mM $CaCl_2$ bei pH 7,0. Beim Test der Ca-Sensitivität der Zellen befanden sich diese in Waschlösung (C, s. o.) mit zusätzlich 0,5 mM EGTA und 1 mM ATP. Die Kontraktion wurde dann durch 1 mM $CaCl_2$ in Waschlösung (C, s. o.) hervorgerufen.

Zur Ermittlung der Kontraktionsraten wurden lichtmikroskopische Aufnahmen der Zellen mit einem Electronic Graphics Calculator (Numonics Corp.) vermessen.

2. Präparation der Muskelproteine

Alle Präparationsschritte erfolgten bei 4 °C. Die Proteinfraktionen wurden entweder direkt nach der Präparation in funktionellen bzw. analytischen Tests eingesetzt oder bis zur weiteren Verwendung in flüssigem Stickstoff gelagert. Hierbei lagen die Fraktionen entweder als Ammoniumsulfat-Pellet vor, oder sie befanden sich in einem Medium, welches im folgenden als Standard-Puffer bezeichnet wird: 20 mM KCl, 30 mM Tris-Maleat-Puffer (pH 7,0) und 5 mM 2-Mercaptoethanol.

2.1 Präparation kontraktiler Proteine der Regenwurmmuskulatur

Die Regenwürmer (*Lumbricus terrestris* L.) wurden aus Anglergeschäften bezogen und lebend bei 4 ° oder 10 °C gehalten.

Für eine Präparation wurden zwischen 50 und 300 Würmer verwendet. Nach Entfernen der inneren Organe wurden die Hautmuskelschläuche in Waschlösung gespült, welche 20 mM KCl, 0,5 mM $MgCl_2$, 0,05 mM PMSF, 100 mg/l Streptomyctin, 20 mM 2-Mercaptoethanol und 10 mM Imidazol-HCl-Puffer (pH 6,4) enthielt. In der gleichen Lösung wurden die Hautmuskelschläuche mit einem Ika Ultra-Turrax^R homogenisiert. Die Suspension wurde 30 Min. bei 20.000 x g zentrifugiert und die erhaltenen Pellets wurden nochzweimal in der oben angegebenen Waschlösung gewaschen.

2.1.1 Präparation nativer Actin-Filamente

Die Präparation nativer Actin-Filamente (Thin filaments) wurde in Anlehnung an die Methode von Szent-Györgyi et al. (1971) durchgeführt. Die Extraktion des Actins wird durch die Dissoziation von Actin- und Myosin-Filamenten bei realtiv geringer ATP-Konzentration (3 mM) ermöglicht, wobei die Myosin-Filamente nicht aufgelöst werden (vgl. Kommentar zur Actomyosin-Extraktion, Kap. III. 2.1). Bei Verwendung von 50 Würmern wurde das wie oben beschrieben gewaschene Pellet in 400 ml der folgenden Lösung zur Extraktion aufgenommen: 3 mM ATP, 4 mM $MgCl_2$, 1 mM DTT, 0,05 mM PMSF, 30 mM Tris-Maleat-Puffer (pH 6,3). Nach zügigem Homogenisieren (Homogenisator nach Potter-Elvehjem mit motorbetriebenen Teflonpistill) wurde die Suspension 60 Min. bei 30.000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden weiter zur Extraktion von Actomyosin verwendet. Aus dem Überstand wurden die nativen Actin-Filamente durch drei-stündige Ultrazentrifugation bei 100.000 x g sedimentiert. Der Extrakt wurde direkt vor der Zentrifugation mit 1 - 2 mM ATP versetzt, um eine Actin-Myosin-Bindung zu verhindern und damit eventuell vorhandene Myosin-Verunreinigungen im Überstand verblei-

ben zu lassen. Die Pellets wurden kurz mit destilliertem Wasser abgespült und in etwa 20 ml einer Lösung von 30 mM Tris und 5 mM 2-Mercàptoethanol suspendiert. Nach vorsichtigem Homogenisieren (handbetriebener Glas-Teflon-Homogenisator) wurde der pH mit 0,5 N HCl auf 7,0 eingestellt. Ausgehend von 50 Würmern betrug die Ausbeute 150 - 200 mg.

2.1.2 Präparation von Tropomyosin-Troponin

Zur Präparation von Tropomyosin-Troponin wurde ein frischer Thin-filament-Extrakt (s. o. Überstand nach Extraktion der gewaschenen Muskelmasse) verwendet. Der Extrakt wurde auf eine NaCl-Konzentration von 1 M gebracht und der pH wurde mit 1 N HCl auf 2,0 erniedrigt. Nach Homogenisierung mit anschließender pH-Kontrolle und 30-minütigem Rühren wurde mit 1 N NaOH neutralisiert und homogenisiert. Durch den niedrigen pH wurde in Anlehnung an die Methode von Hartshorne & Mueller (1968) das Actin und eventuell vorhandene Myosin-Verunreinigungen irreversibel denaturiert und durch zwei-stündige Zentrifugation bei 100.000 x g sedimentiert. Aus dem Überstand wurde Tropomyosin-Troponin durch 65 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung ausgefällt und durch Zentrifugation (30 min. bei 20.000 x g) gesammelt. Das Pellet wurde in Standard-Puffer gelöst und gegen die gleiche Lösung dialysiert. Die Ausbeute betrug ausgehend von 50 Würmern zwischen 100 und 150 mg.

2.1.3 Präparation von Actomyosin, Actin-angereichertem Actomyosin und Myosin

Die Extraktion von Actomyosin erfolgte bei niedriger Ionenstärke und relativ hoher ATP-Konzentration (10 mM, Erläuterungen hierzu s. Kap. III. 2.1). Das gewaschene Hautmuskelschlauch-Homogenat (s. Kap. II. 2.1) wurde in folgender Lösung aufgenommen: 40 mM KCl, 40 mM Imidazolpuffer (pH 7,2), 1 mM EDTA, 2 mM EGTA, 10 mM ATP und 1 mM DTT. Nach gründlichem Homogenisieren wurde das nicht gelöste Material abzentrifugiert (60 Min. bei 20.000 x g). Aus dem Überstand wurde durch 45 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung Actin-angereichertes Actomyosin ausgefällt. Das Präzipität wurde durch Zentrifugation (30 Min. bei 20.000 x g) gesammelt. Das Pellet wurde in Standard-Puffer aufgenommen und gegen die gleiche Lösung dialysiert. Das im Überstand befindliche Myosin wurde durch 55 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung gefällt und durch Zentrifugation (30 Min. bei 20.000 x g) gesammelt. Das Pellet wurde in etwa einem Volumen Standard-Puffer gelöst, die Lösung wurde klarzentrifugiert (60 Min. bei 100.000 x g) und anschließend gegen Standard-Puffer dialysiert. Ausgehend von 100 Würmern betrug die Ausbeute an Actin-angereichertem Actomyosin zwischen 4,5 und 4,5 g und die Ausbeute an Myosin etwa 1 g.

Zur Gewinnung von unfraktioniertem Actomyosin (Gesamt-Actomyosin) wurde der Extrakt direkt auf 60 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht. Die so in ihrer Gesamtheit präzipitierten Proteine des Hautmuskelschlauch-Extraktes wurden durch Zentrifugation (30 Min. bei 20.000 x g) gesammelt und das Pellet wurde in Standard-Puffer aufgenommen und gegen die gleiche Lösung dialysiert.

Die Präparation von desensibilisiertem Actomyosin erfolgte nach der Methode von D'Haese (1980).

2.1.4 Präparation von Tropomyosin und Troponin

Das Ausgangsmaterial für die Präparation von Tropomyosin und Troponin war meist das durch 45 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung des Actomyosin-Extraktes erhaltene Actin-angereicherte Actomyosin. Das Pellet wurde nach Dialyse gegen Standard-Puffer mit folgender Lösung extrahiert: 1 M LiCl, 40 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Imidazolpuffer (pH 7,5) 1 mM DTT und 0,05mM PMSF. Nach 30-minütigem Rühren wurde unlösliches Material durch Zentrifugation (60 min. bei 30.000 x g) entfernt. Der pH der Lösung wurde mit 1 N HCl auf 4,6 erniedrigt und das entstandene Präzipitat wurde durch Zentrifugation (60 Min. 30.000 x g) gesammelt. Der pH des Überstandes wurde mit 1 N KOH auf 7,2 eingestellt und durch Zugabe von Ammoniumsulfat bis zur 65 %igen Sättigung wurde eine rohe Troponin-Fraktion ausgefällt. Das Päzipitat wurde durch Zentrifugation (30 Min. 30.000 x g) gesammelt und das Pellet wurde in Standard-Puffer suspendiert und gegen die gleiche Lösung dialysiert.

Zur Präparation von Tropomyosin wurde das durch Erniedrigung des pH auf 4,6 erhaltene Pellet in folgender Lösung aufgenommen: 1 M NaCl, 40 mM KCl, 1 mM $MgCl_2$, 10 mM Imidazolpuffer (pH 7,0) und 1 mM DTT. Das unter diesen Bedingungen unlösliche Material wurde nach ca. 30-minütigem Rühren der Suspension abzentrifugiert (60 Min bei 30.000 x g). Der Überstand wurde auf 30 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung gebracht und nach Abzentrifugieren (30 Min bei 30.000 x g) des Präzipitates (hauptsächlich Paramyosin), wurde aus dem Überstand durch

durch 65 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung rohes Tropomyosin ausgefällt und durch Zentrifugation (30 Min bei 30.000 x g) gesammelt. Die Hauptverunreinigung der Fraktion bestand aus Paramyosin, welches durch Dialyse des in Standard-Puffer aufgenommenen Pellets gegen die gleiche Lösung jedoch bei pH 5,5 zum Ausfallen gebracht wurde. Das Präzipitat wurde abzentrifugiert (15 Min. bei 30.000 x g) und der Überstand wurde auf pH 7,0 gebracht. Ausgehend von 100 Würmern betrug die Ausbeute an rohem Tropomyosin zwischen 80 und 100 mg.

Die Angaben zur Ionenaustauscher-Chromatographie der rohen Tropomyosin-Fraktion sowie ihrer Untereinheiten sind unter den jeweiligen Elutionsdiagrammen in Kap. III. 3.1 (Abb. 20 - 22) aufgeführt. Die partielle Auftrennung der rohen Troponin-Fraktion erfolgte unter den gleichen Bedingungen wie die Reinigung und Fraktionierung des rohen Tropomyosins (s. Abb. 20), jedoch bei pH 7,0.

2.1.5 Herstellung von Tropomyosin-Parakristallen

Zur Bildung von Tropomyosin-Parakristallen wurden Tropomyosin-Fraktionen (5 - 8 mg/ml) gegen folgende Lösungen dialysiert: 1) 60 mM KCl, 50 mM $MgCl_2$, 30 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6), 2) 60 mM KCl, 50 mM $CaCl_2$, 30 mM Tris-HCl-Puffer (pH 7,6) 3) 0,2 M KCl, 10 mM Natriumazetatpuffer (pH 5,3). Die Dialyse erfolgte bei 4 ^{o}C und dauerte zwischen drei und sechs Tagen.

2.2 Präparation kontraktiler Proteine der Kaninchen-Skelettmuskulatur

Actin wurde nach einer modifizierten Methode von Spudich & Watt (1971) hergestellt. Die Präparation von Myosin erfolgte nach der Methode von Szent-Györgyi (1951). Die Myosin-Subfragmente HMM und SF1 wurden nach der Methode von Weeds & Taylor (1975) und Margossian & Lowey (1973) hergestellt. Die Präparation von Tropomyosin erfolgte prinzipiell nach der Methode von Bailey (1948) und Troponin wurde nach der Methode von Ebashi et al. (1971) mit Modifikationen nach Wilkinson (1974) präpariert.

3. Licht- und elektronenmikroskopische Untersuchungsmethoden

Die lichtmikroskopischen Untersuchungen der Zellen wurden an einem Leitz Dialux 20 und einem Zeiss Photomikroskop III durchgeführt. Die kinematographischen Aufnahmen erfolgten mit einem Inversen Mikroskop IM 35 für Durchlicht von Zeiss, welches mit einer Bolex H 16 Kamera und einem Variotimer von Wild ausgerüstet war. Das verwendete Filmmaterial war PAN F von Ilford und Plux-X Negative von Eastman-Kodak (16 mm).

Für die elektronenmikroskopischen Untersuchungen wurden pelletierte Zellen bzw. Gewebestücke des Hautmuskelschlauches in 2,5 % Glutaraldehyd in 0,1 M Cacodylatpuffer (pH 7,3) bei 4 ^{o}C fixiert, in 0,1 M Cacodylatpuffer gewaschen und anschließend kontrastiert und nachfixiert in 1 % OsO_4 in 0,1 M Cacodylatpuffer. Nach er-

neutem Waschen in Cacodylatpuffer wurde das Material über die Ethanolreihe entwässert und in Propylenoxid überführt. Die Blockkontrastierung erfolgte dabei in 70 % Ethanol mit 1 % Phosphorwolframsäure und 1 % Uranylacetat. Über die Mischungsstufen Propylenoxid : Araldit im Verhältnis 3 : 1 (1 h), 1 : 1 (über Nacht) und 1 : 4 (4 h) wurde das Material in reines Araldit eingebettet. Die Polymerisation des Kunststoffes erfolgte 24 Stunden bei 45 °C für weitere drei Tage bei 60 °C.

Die Ultradünnschnitte wurden auf unbefilmten Kupfernetzen aufgefangen und mit methanolischer Uranylacetatlösung und mit Bleicitrat nach Reynolds (1963) nachkontrastiert.

Zur Untersuchung der Tropomyosin-Parakristalle wurden die Proben auf mit Formvar befilmten und mit Kohle bedampften Netzchen mit 1 %iger wäßriger Uranylacetatlösung negativ-kontrastiert (Huxley, 1963).

Die Untersuchungen erfolgten an den Elektronenmikroskopen EM 300 (Philips) und EM 10 (Zeiss).

4. Analytische Methoden

4.1 Protein- und ATPase-Aktivitätsbestimmung

Proteinkonzentrationen wurden nach der Methode von Lowry et al. (1951) unter Verwendung eines Standards von Rinderserumalbumin und nach der Bio-Rad-Methode (Bradford, 1976) ermittelt.

Die ATPase-Aktivität von Actomyosin, Acto-HMM bzw. Acto-SF1 wurde, falls nicht anders angegeben, in einem Medium folgender Zusammensetzung ermittelt: 20 mM KCl, 2 mM $MgCl_2$, 1 mM MgATP, 30 mM Tris-Maleat-Puffer (pH 7,0) und 0,1 mM $CaCl_2$ oder 2 mM EGTA. Das Reaktionsvolumen betrug 1 ml. Nachdem die Proteinmischungen 10 Min. bei 25 °C inkubiert worden waren, wurde die Reaktion durch Zugabe von ATP gestartet. Nach 1 - 3 Min. wurde die Reaktion durch Zugabe von Trichloressigsäure (Endkonz. 5 %) beendet. Die Menge an abgespaltenem anorganischem Phosphat (P_i) wurde nach der Methode von Fiske & Subbarow (1925) bestimmt. Bei der Ermittlung der ATPase-Aktivitäten in Abhängigkeit von der Ca-Konzentration wurden die unterschiedlichen Ca-Konzentrationen durch einen CaEGTA/EGTA-Puffer (2 mM) nach Weber (1969) erreicht. ATPase-Aktivitätsbestimmungen bei variierenden ATP-Konzentrationen wurden unter Verwendung des Kreatin-Phosphokinase-ATP-Regenerationssystems nach Bremel et al. (1972) durchgeführt. Die Ca-Sensitivität von Actomyosin-Systemen wurde in % der Hemmung bei Abwesenheit von Ca ausgedrückt und wie folgt errechnet:

$$\left(1 - \frac{\text{ATPase-Aktivität mit EGTA}}{\text{ATPase-Aktivität mit Ca}} \right) \times 100$$

4.2 SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese (SDS-PAGE)

Die Elektrophorese (modifiziert nach Laemmli, 1970 und Chua, 1980) wurde in Plattengelen von 1 mm x 140 mm x 180 mm mit einem linearen Acrylamidgradienten von 9 - 17 % in 0,38 M Tris-HCl (pH 8,8) und 0,2 % SDS durchgeführt. Die verwendete Acrylamidstammlösung war 30 %ig und enthielt 1,1 % N,N'-Methylenbisacrylamid. Zur Polymerisation wurden die Lösungen auf 0,03 bzw. 0,05 % TEMED

und 0,04 % APS gebracht. Das Trenngel wurde nach dem Gießen mit einigen Tropfen Isobutanol überschichtet, welches nach der Polymerisation abgespült wurde. Das Sammelgel enthielt 4 % Acrylamid in 0,125 M Tris-HCl (pH 6,8) und 0,1 % SDS und wurde zwischen teflonbeschichteten Kämmen verteilt, welche für eine Platte 18 Probentaschen von 0,5 cm Breite ergaben. Die Bisacrylamid-Konzentration der 30 % Acrylamid-Stammlösung für das Sammelgel wurde auf 1,3 % erhöht, um eine höhere Stabilität der Taschen beim Entfernen der Kämme zu gewährleisten. Zur Polymerisation des Sammelgels wurden TEMED und APS in 0,1 %iger Endkonzentration eingesetzt. Der Elektrodenpuffer enthielt 0,025 M Tris-HCl (pH 8,3), 0,192 M Glycin und 0,1 % SDS. Die aufzutrennenden Proben wurden mit einer zehn-fach konzentrierten Inkubationslösung zur Erreichung folgender Endkonzentrationen versetzt: 0,06 M Tris-H_3PO_4 (pH 6,8), 2 % SDS, 5 % 2-Mercaptoethanol. Nach zwei-minütigem Kochen wurden Bromphenolblau und Glycerin für Endkonzentrationen von 0,001 % bzw. 5 % zugegeben (mod. nach Laemmli, 1970). Nach Auftragen der inkubierten Proben erfolgte die Elektrophorese bei zwei Gelplatten mit 70 mA und 400 pps (Pulse pro sec.) bei 4 ^{o}C für etwa 15 Stunden. Fixiert und gefärbt wurden die Gele in 17,5 % Methanol, 6,25 % Eisessig, 5,6 % TCA und 0,2 % Coomassie Brillant Blue bzw. Serva blau. Entfärbt wurde mit 30 % Methanol und 5 % Eisessig.

4.3 Zwei-dimensionale Elektrophorese

Die zwei-dimensionale Elektrophorese wurde prinzipiell nach der Methode von O'Farrell (1975) mit folgenden Modifikationen durchgeführt. Die Rundgele für die isoelektrische Fokussierung waren bei einem Durchmesser

von 2,4 mm etwa 14 cm lang. Die Gelmischung enthielt 2 % Ampholine, deren pH-Bereich durch Variation der Mischungsverhältnisse käuflicher Stammlösungen (Firma LKB) variiert wurde. Für die Trennung von Proteinen mit eng beieinanderliegendem isoelektrischen Punkt um pH 4,6 (verschiedene Tropomyosine) und zusätzliches Erfassen der Randbereiche bei pH 4,0 und 6,0 hatte sich die folgende Mischung gewährt: 60 % pH 4,0 - 6,0; 20 % pH 3,5 - 5,0; 20 % pH 5,0 - 7.0. Durch eine Oberflächenelektrode wurde der tatsächlich im Gel vorliegende pH-Gradient direkt nach der Fokussierung ermittelt. Die Lösung zum Überschichten der Proben nach Auftragen auf die Rundgele enthielt nur 5 M Harnstoff, um eine bessere Phasengrenze zu der 9 M Harnstoff enthaltenen Probe zu erreichen. Das Produkt von Laufzeit (in Stunden) und Stromspannung (in Volt) betrug ca. 10.000 Voltstunden. Färben und Fixieren der nicht zur zweiten Dimension im SDS-System bestimmten Gele erfolgte nach den Angaben von Görg et al. (1978).

Die fokussierten Proteine wurden in dem oben beschriebenen (Kap. II. 3.2) SDS-PAGE-System aufgetrennt. Hierzu wurden die Rundgele eine Stunde in einer nach Laemmli (1970) modifizierten Inkubationslösung equilibriert, welche die gleichen Endkonzentrationen hatte, wie sie oben für die inkubierten Protein-Proben vor ihrer Auftrennung im SDS-PAGE-System angegeben wurden. Zur Montage des Rundgels wurde die Oberfläche des Sammelgels folgendermaßen gestaltet. Die obere Kante der einen das Flachgel begrenzenden Glasplatten wurde schräg angeschliffen, um den Plattenzwischenraum von 1 mm genügend (auf mehr als 2,4 mm) zu erweitern. Auf die eingefüllte Sammelgellösung wurde vor der Polymerisation ein runder PVC-Stab mit dem Durchmesser des Rundgels gelegt. In die entstandene Rinne konnte nach Polymerisation des Sammel-

gels das equilibrierte Rundgel eingelegt werden, wobei ein bestmöglicher Kontakt der beiden Gele angestrebt wurde. Im Gegensatz zur Methode von O'Farrell (1975) wurde die 1 %ige Agarose demzufolge nur zur oberflächlichen Fixierung des Rundgels benötigt, was sich im Hinblick auf die Punktschärfe im Flachgel als vorteilhaft erwiesen hatte. Die Gelplatten wurden nach der Elektrophorese zur Fixierung und zur Entfernung der Ampholine einige Stunden in 50 % Methanol gewaschen und anschließend nach O'Farrell (1975) gefärbt und entfärbt.

4.4 Gelfiltration von Tropomyosin

Die Gelfiltration von Tropomyosin wurde mit Ultrogel AcA 34 (Firma LKB) in einer Säule von 1,5 cm x 60 cm vorgenommen. Der Säulen-Puffer enthielt 0,5 M NaCl, 30 mM Tris-Maleat-Puffer (pH 7,0) und 5 mM 2-Mercaptoethanol. Die Kalibrierung der Säule erfolgte durch den Pharmacia-Calibration-Kit Nr. 9013 sowie durch Skelettmuskel-Tropomyosin mit bekanntem Molekulargewicht (70.000). Die Durchflußgeschwindigkeit betrug 20 ml/h. Es wurden jeweils 4 - 6 mg Tropomyosin in 1 - 2 ml Säulen-Puffer aufgetragen.

III. Ergebnisse

1. Strukturelle Untersuchungen der schräggestreiften Muskulatur des Regenwurms

1.1 Untersuchungen an isolierten Muskelzellen

Bei der Aufklärung der Organisation und Funktionsweise des kontraktilen Apparats der quergestreiften Skelettmuskulatur haben isolierte Zellen und Myofibrillen als Modellsystem eine bedeutende Rolle gespielt (zusf. Darst. Huxley, 1972). Auch bei Untersuchungen der glatten Vertebratenmuskulatur hat das Kontraktionsverhalten solcher Modelle wesentlich zum Verständnis der Filamentorganisation beigetragen (Bagby et al., 1971; Fay & Delise, 1973; Small, 1974, 1977).

Isolierte Zellen bieten den Vorteil, daß sie unter Beibehaltung der in vivo bestehenden Anordnung der kontraktilen Elemente durch Herauslösung aus dem Zellverband sowohl der Betrachtung als auch der Manipulation, z.B. durch verschiedene Medien, zugänglicher sind. Es wäre schwerlich möglich, den Verkürzungsgrad einer kontrahierten Zelle und ihre Formveränderung im Gewebeverband zu ermitteln.

Untersuchungen an der schräggestreiften Muskulatur vom Regenwurm wurden bisher vorwiegend an Stücken des Hautmuskelschlauchs durchgeführt, wobei keine eindeutigen Aussagen über die aktuelle Längenverkürzung im Zusammenhang mit strukturellen Veränderungen möglich waren. Daher wurde angestrebt, Zellen der Muskulatur des Regenwurms zu isolieren, um ihre Feinstruktur und ihr Kontraktionsverhalten zu untersuchen.

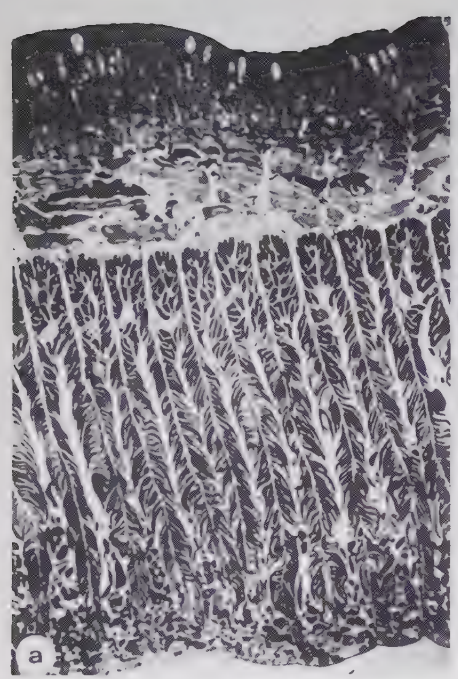
Zum Herauslösen von Zellen aus dem Gewebeverband hat sich die Anwendung von Collagenase als wirkungsvoll erwiesen. Dies geht u.a. aus den Arbeiten über Zellisolierungen der

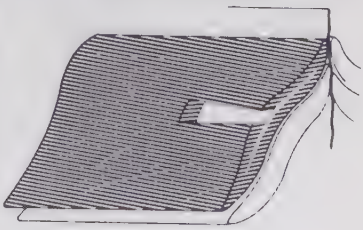
glatten Muskulatur (s.o.) und des Herzmuskels (Eckel & Reinauer, 1980) hervor. Auch in der Gewebekultur wird Collagenase zum Abernten von Zellrasen angewendet. Die im Handel erhältlichen Collagenasepräparate enthalten neben Collagenase noch andere Proteasen wie Clostripain, Trypsin und Dispase, deren enzymatische Aktivität zur proteolytischen Wirkung des Gesamtgemisches beiträgt.

Um für die Kontraktionsexperimente möglichst erschlaffte Muskelzellen zu erhalten, wurden die Gewebestücke unter Dehnung, d.h. in gestrecktem Zustand in EGTA-haltigem Medium vorinkubiert. Es mußte jedoch auf die Anwesenheit von EGTA in der Enzymlösung verzichtet werden, da die proteolytische Aktivität der Collagenase durch den Komplexbildner gehemmt wird. Die Ablösung der Zellen aus dem Gewebe war zeit- und temperaturabhängig. Die Temperatur des Inkubationsmediums wurde zwischen 25° und 35°C variiert. Bei 35°C war die Collagenaseinkubation am wirkungsvollsten. Schon nach einer Stunde konnte das Peritoneum abgezupft werden. Die weitere Inkubation erfolgte unter kräftigem Schütteln und zeitweiliger mechanischer Bearbeitung mit Nadel und Pinzette. Nach etwa drei Stunden konnten aus dem nun weißlich gefärbten und aufgequollen erscheinenden Gewebe schon durch den mit einer Pasteurpipette erzeugten Pufferstrom schonend Zellen ausgeschwemmt werden.

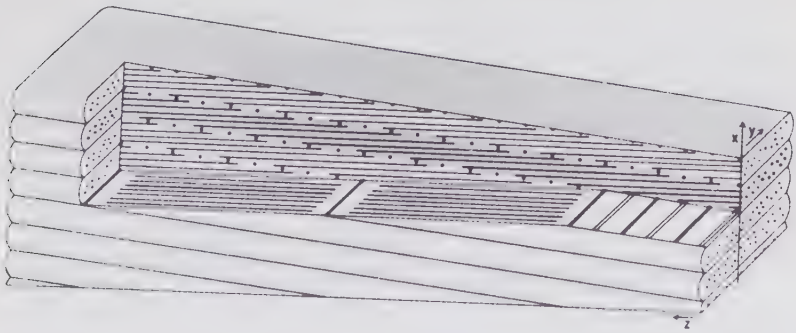
Zur Verdeutlichung der Herkunft der Zellen zeigt Abb. 2 a einen Querschnitt durch den Hautmuskelschlauch des Regenwurms. Unter der Epidermis liegt die Ringmuskelschicht und darunter befindet sich die sechs- bis achtmal so dicke Längsmuskelschicht. Die Zellen der Längsmuskulatur sind bandförmig und haben spitz zulaufende Enden (Abb. 2 b). Ihre Länge beträgt 2,5 - 3 mm bei einer Dicke von nur etwa 2 - 5 µm. Die Flachseite der Zellen ist etwa 20 µm breit. Aus Abb. 2 a ist die Anordnung der Zellen innerhalb der Längsmuskulatur ersichtlich. Sie sind mit einer Kante an radial den Wurm durchziehenden Bindegewebssepten

Abb. 2: Übersicht über den Aufbau des Regenwurm-Hautmuskelschlauchs (a) aus Einzelzellen (b) und Darstellung der Fibrillen- und Filamentanordnung innerhalb der Muskelzellen (c und d). (a) Semidünnschnitt quer durch den Regenwurm-Hautmuskelschlauch (Vergrößerung x 180); (b) isolierte Längsmuskelzelle im Differential-Interferenzkontrast (Vergrößerung x 220); (c)Teilstücke aus Längsmuskelzellen, die Linien der Schraffierung entsprechen den A-Banden, d.h. den Myosin-Filamentlagen; es wird deutlich, daß das kontraktile Material in den peripheren Zellbereichen angeordnet ist; der Ausschnitt aus einer Zellfachseite ist in (d) vergrößert dargestellt; (d) schematische Darstellung der Anordnung der Myosin-Filamente, Z-Stäbe und tubulären Elemente des SR in dem aus (c) ersichtlichen Blockausschnitt; in der xy-Ebene sind die Fibrillen quer geschnitten; der Längsschnitt in der yz-Ebene zeigt die Anordnung der Myosin-Filamente innerhalb der Sarkomere; der Längsschnitt in der xz-Ebene verdeutlicht die Staffelung der Myosin-Filamente; eine Fibrille ist durch dunklere Tönung hervorgehoben; sie ist seitlich begrenzt von den alternierend auftretenden Z-Stäben (gefüllte Punkte) und den Tubuli des SR (offene Punkte).





c



d

verankert, während die andere Kante der Zellen frei liegt. Dies ist in Abb. 2 c schematisch dargestellt. Die einzelnen Linien der Schattierung des oberen Zellsegmentes sollen die schrägverlaufenden Fibrillen andeuten. Aus der rechts im Bild sichtbaren Querschnittsfläche geht hervor, daß das kontraktile Material im peripheren Zellbereich angeorndet ist.

In Ergänzung zu den Erläuterungen in der Einleitung soll die Schemazeichnung in Abb. 2 d die Anordnung der Filamente veranschaulichen. Das bei der Schraffierung in Abb. 2 c ausgesparte Zellstück bezeichnet das Segment, welches in Abb. 2 d detaillierter dargestellt ist. Zur besseren Einordnung der unterschiedlichen Strukturaspekte verschiedener Schnittebenen wurde das von Rosenbluth (1965) eingeführte Koordinatensystem übernommen. Damit lassen sich drei Schnittebenen definieren. Die xy-Ebene verläuft quer zur Faserlängsachse und die quergeschnittenen Myosin-Filamente sind im Schema durch Punkte angedeutet. Auf eine Darstellung der Actin-Filamente wurde in der ganzen Zeichnung verzichtet. Die beiden anderen Schnittebenen verlaufen parallel zur Faserlängsachse. Hierbei liegt die xz-Ebene parallel zur Flachseite der Zelle, während die yz-Ebene senkrecht auf ihr steht. In der yz-Ebene sind zwei Sarkomere sichtbar. Die parallel verlaufenden dünneren Linien stellen die Myosin-Filamente dar. Bei Betrachtung der durch die xz-Achsen bezeichneten Schnittfläche wird die Staffelung der Myosin-Filamentlagen deutlich. Die Punkte stellen alternierend Querschnitte von Z-Stäben und Tubuli des Sarkoplasmatischen Retikulums dar. Eine der als Fibrillen bezeichneten Strukturen ist durch dunklere Tönung hervorgehoben.

Die isolierten Zellen wurden lichtmikroskopisch im Differential-Interferenzkontrast und im Phasenkontrast untersucht. Dabei wurde die bandartige Form der Zellen besonders dann deutlich, wenn durch die Verdrehungen der Zellen um ihre

Längsachse die Sicht auf eine der schmalen Kanten ermöglicht wurde (Abb. 3 a). Verwindungen dieser Art waren bei fast allen betrachteten Zellen festzustellen und ihr Auftreten war hinsichtlich ihres Abstandes voneinander immer unregelmäßig. Die Oberfläche der meisten Zellen erschien glatt und eine Schrägstreifung, bzw. doppelte Schrägstreifung war bei nicht weiter behandelten Zellen (s.u.) nur sehr schwer oder gar nicht zu erkennen. Manche Zellen hatten an den Spitzen durch Aufreißen der Zellmembran und Austreten fibrillärer Strukturen ein pinselartiges Aussehen.

Die durch zwei- bis vierstündige Collagenaseinkubation gewonnenen Zellen färbten sich fast alle bei Zusatz von Trypanblau, woraus geschlossen werden konnte, daß die Zellmembranen, wahrscheinlich durch die Collagenasebehandlung, geschädigt und zumindest teilweise permeabel geworden waren (vgl. Kominz & Gröschel-Stewart, 1973; Small, 1974). Dies war insofern von Bedeutung, da es eine Voraussetzung für die weiteren Arbeiten war, daß die kontraktilen Strukturen der Zellen in Kontakt mit dem Außenmedium und den zugesetzten Substanzen standen.

Durch Zugabe von Kontraktionslösung (s. Kap. II. 1.2) konnten fast alle Zellen zur Kontraktion gebracht werden (Abb. 3 und 4).

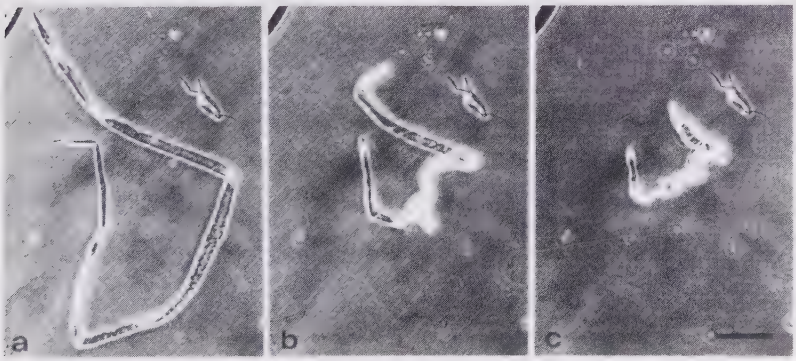
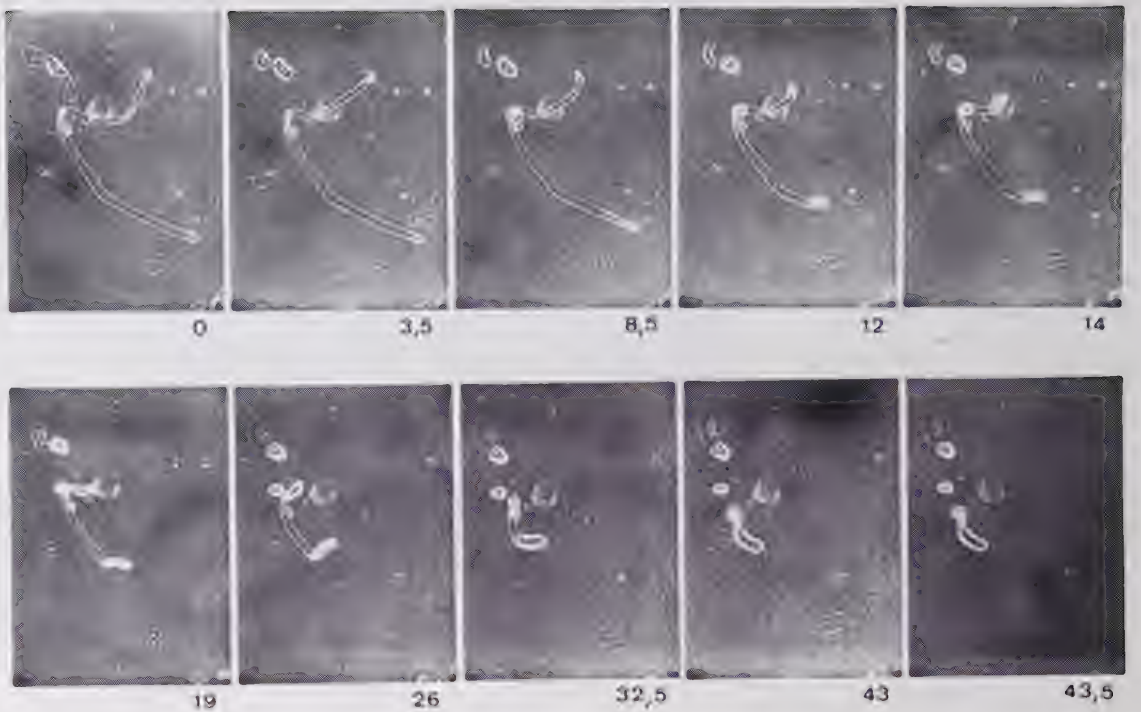


Abb. 3: Kontraktion einer isolierten Zelle der Längsmuskulatur des Regenwurms auf etwa 25 % ihrer Ausgangslänge. Lichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast. Die Länge des Maßstrichs entspricht 0,1 mm.

Abb. 4: Zeitlicher Ablauf der Kontraktion einer isolierten Zelle (Fragment) der Längsmuskulatur des Regenwurms. Zehn Bilder aus einer kinematographischen Aufzeichnung des Kontraktionsverlaufs im Phasenkontrast. Die Zahlen unter den Bildern geben den Zeitraum in sec. ausgehend vom Kontraktionsbeginn an. Vergrößerung: x 80.


0
3,5
8,5
12
14
19
26
32,5
43
43,5

Es zeigte sich, daß neben ATP auch geringe Konzentrationen an Ca notwendig waren. Für diesen Nachweis wurden die Zellen in ATP-haltigem Medium aufgenommen und ihre Kontraktion erfolgte erst nach Zugabe von Ca. Das bedeutet, daß die Kontraktion genauso wie die ATPase-Aktivität des isolierten Actomyosins der Regenwurmmuskulatur (s. Kap. III. 2.) Ca-sensitiv ist.

Zum Studium des Kontraktionsverhaltens der Zellen wurde durch eine Silikonisierung des Glasmaterials versucht, ein Anhaften der Zellen am Träger zu vermeiden, und so die Bedingungen für eine möglichst isotonische Kontraktion zu schaffen.

Bei der Kontraktion fand eine Verkürzung der Zellen in Richtung ihrer Längsachse statt, wobei sich die Breite nur unwesentlich änderte. Die Zellen kontrahierten durchschnittlich bis auf 25 % ihrer Ausgangslänge. Wenn Verkürzungen auf bis zu 15 % der Ausgangslänge gemessen wurden, so war das möglicherweise darauf zurückzuführen, daß ein Auffalten oder Aufrollen der Zellen nach der Kontraktion bei der Messung nicht berücksichtigt wurde. Meist war nicht die gesamte Zelle gleichzeitig am Kontraktionsprozeß beteiligt, sondern dieser begann an einem oder an beiden Enden der Zelle und setzte sich dann bis zur Mitte hin fort. Dies geht besonders deutlich aus Abb. 4 hervor und ist eventuell auf die Art der ATP-Applikation (s. Kap. II. 1.2) zurückzuführen.

Bis zum Abschluß des Kontraktionsvorganges benötigen die meisten der untersuchten Zellen etwa 40 sec. Dies entspricht einer mittleren Kontraktionsrate von etwa 2 % Längenverkürzung/sec. Für relativ langsam kontrahierende Zellen lag die Kontraktionsrate unter 1 und für manche sehr schnell kontrahierende Zellen über 15 % Längenverkürzung/sec.

In Verbindung mit der Kontraktion waren meist Veränderungen der Zelloberfläche zu beobachten. Abb. 5 a zeigt eine nicht kontrahierte Zelle im Vergleich zu einem Stadium, bei welchem sie auf etwa 60 % der Ausgangslänge kontrahiert ist (Abb. 5 b). Deutlich sind in Abb. 5 b Auffaltungen der Zellmembran zu sehen. Da die Zelle in Abb. 3 a auch schon solche Veränderungen zeigt, kann angenommen werden, daß sie zum Zeitpunkt der Aufnahme bereits leicht kontrahiert war. Neben diesen Membranauffaltungen wurden blasenartige Ausstülpungen bemerkt, die besonders gut im Differential-Interferenzkontrast (Abb. 5 c) sichtbar waren.

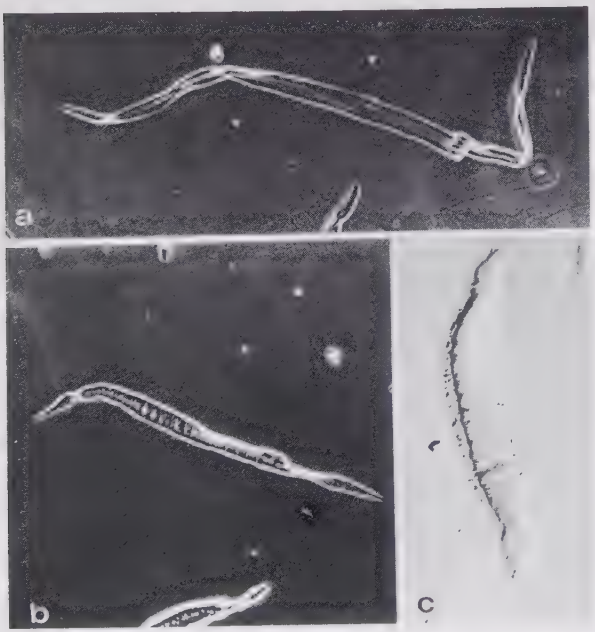


Abb. 5: Vergleich der Oberflächenstruktur von isolierten Zellen der Regenwurmmuskulatur vor (a) und während bzw. nach (b und c) der Kontraktion. Lichtmikroskopische Aufnahme im Phasenkontrast (a und b) und im Differential-Interferenzkontrast (c). Vergrößerung: (a und b) x 190, (c) x 290.

1.2 Untersuchungen an glycerinierten Muskelzellen

Die Glycerinierung von Skelettmuskelzellen (Szent-Györgyi, 1951) ermöglichte es erstmals, die Interaktion von Actomyosin mit ATP nicht nur - wie bis dahin üblich - an Gelsuspensionen und Actomyosin-Fäden zu untersuchen, sondern am, in der natürlichen Ordnung vorliegenden, zur Spannungsentwicklung befähigten, kontraktilen Apparat der Muskelzelle. Durch die Glycerinbehandlung wurden etwa 50 % der sarcoplasmatischen Proteine extrahiert und die Zellmembran wurde zerstört. Demzufolge lag schließlich eine Art von Actomyosinskelett in Form von Myofibrillen vor, welches durch ungehinderten Kontakt mit ATP zur Kontraktion gebracht werden konnte.

In Anlehnung an die Methode von Szent-Györgyi (1951) wurden die isolierten Zellen der Regenwurmmuskulatur einer Glycerinbehandlung unterzogen (s. Kap. II. 1.2). Nach dem Auswaschen des Glycerins mit modifizierter Hank's Lösung wurden sie lichtmikroskopisch untersucht. Abb. 6 veranschaulicht die offensichtlichen Veränderungen, die die Glycerinextraktion bewirkt hatte. Es waren deutlich schräg zur Längsachse der Zelle verlaufende Fibrillen zu erkennen. Da auch die Fibrillen der gegenüberliegenden Zellflachseite sichtbar waren, ließ sich die doppelte Schrägstreifung häufig beobachten. Oft hatten sich die Fibrillen derart aus ihrer ursprünglichen Anordnung - welche im linken Bildteil von Abb. 6 a noch angedeutet ist - gelöst, daß sie nur noch in Büscheln vorlagen.

Wie für die nativen Regenwurmzellen beschrieben, kontrahierten auch die glycerinierten Zellen bei Zugabe von Kontraktionslösung. Die Abb. 7 und 8 zeigen verschiedene Kontraktionsstadien, aus denen deutlich hervorgeht, daß die Verkürzung der gesamten Zellstücke auf der Kontraktion der einzelnen Fibrillen beruhte. Die auf Abb. 7 a

Abb. 6: Lichtmikroskopische Aufnahmen von glycerinierten Zellen im Phasenkontrast (a) und im Differential-Interferenzkontrast (b). Die Fibrillen (A-Banden) sind auseinandergewichen und deutlich ist die doppelte Schrägstreifung sichtbar. Der Maßstrich entspricht 50 µm.

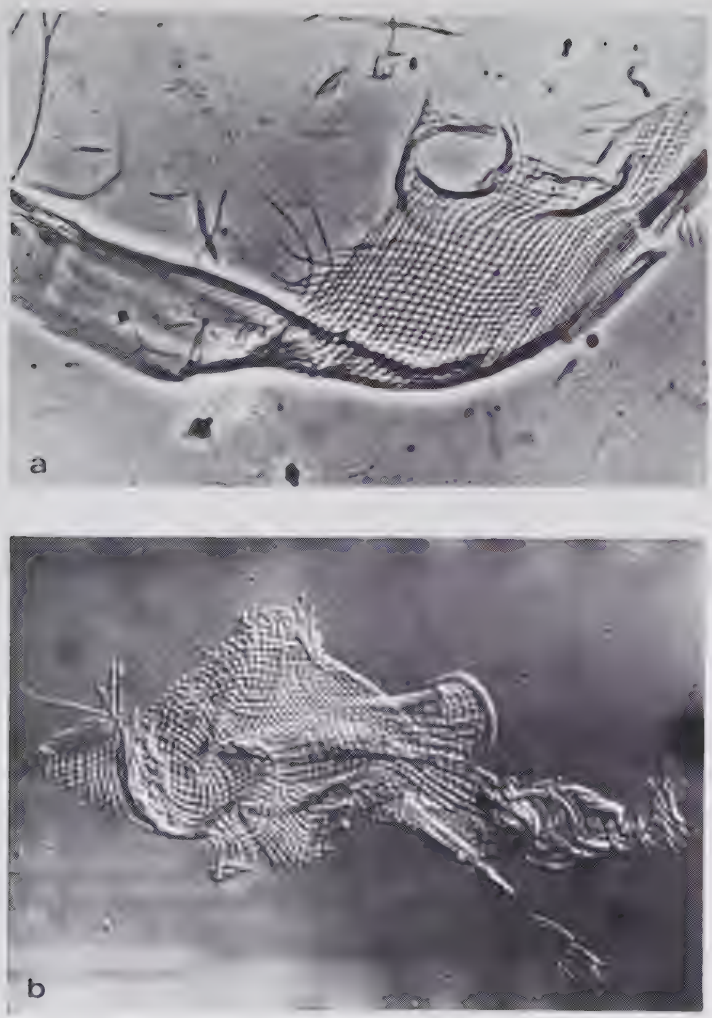

a
b

Abb. 7: Kontraktion einer glycerinierten Zelle der Regenwurmmuskulatur. Lichtmikroskopische Aufnahmen im Phasenkontrast. Es wird deutlich, daß die Verkürzung des gesamten Zellfragmentes durch die Kontraktion der einzelnen Fibrillen bewirkt wird. Der Maßstrich entspricht 50 µm.

a
b
c
d
e
f

noch in leichtem Bogen anscheinend locker liegenden Fibrillen im Mittelteil der Zelle haben sich bei dem in Abb. 7 b dargestellten Stadium sichtlich gespannt.

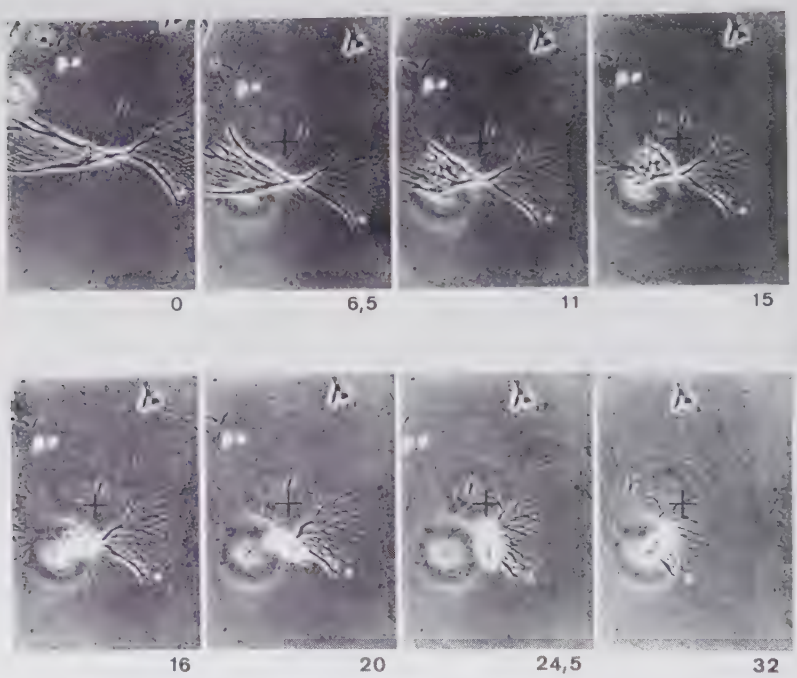


Abb. 8: Zeitlicher Ablauf der Kontraktion einer isolierten glycerinierten Zelle der Regenwurmmuskulatur. Acht Bilder aus einer kinematographischen Aufzeichnung des Kontraktionsverlaufs im Phasenkontrast. Die Zahlen unter den Bildern geben den Zeitraum in sec. ausgehend vom Kontraktionsbeginn an. Vergrößerung: x 270.

Das in Abb. 7 b noch erkennbare Netzwerk aus Fibrillen sowie die an den Enden pinselförmig liegenden Fibrillen kontrahierten schließlich bis auf ein knäuelförmiges Endstadium (Abb. 7 f). Daß tatsächlich eine Kontraktion der einzelnen Fibrillen vorlag, wurde besonders dadurch deut-

lich, daß auch ganz isoliert voneinander liegende Fibrillen sich verkürzten und sich aufgrund von Anheftung am Glasträger und infolge der entwickelten Spannung selbst zerrissen.

Die glycerinierten Zellen benötigten zur Kontraktion durchschnittlich 20 sec. Zur Ermittlung der Kontraktionsraten wurde die Länge der Zellfragmente ermittelt solange noch die einzelnen Fibrillen sichtbar waren. Die Ausmaße der am Ende der Kontraktion vorliegenden Fibrillenknäuel wurden geschätzt. Eine Kontraktion bis zu diesem Stadium mußte als unphysiologisch angesehen werden. Es ergaben sich Kontraktionsraten von etwa 4 % Verkürzung/sec.

Die Kontraktionsfähigkeit einzelner Fibrillen läßt vermuten, daß diese die kontraktilen Einheiten darstellen, daß also die Kontraktion einer Zelle durch die Kontraktion des Fibrillengerüsts bewirkt wird. Daher wurde versucht, den feinstrukturellen Aufbau der Fibrillen durch elektronenmikroskopische Untersuchungen zu klären.

Abb. 9 zeigt das elektronenmikroskopische Bild eines Querschnitts durch eine glycerinierte Regenwurmmuskelzelle. Die längliche Schnittfläche setzt sich zusammen aus den Querschnitten einzelner Fibrillen. Auch hier wird deutlich, daß die Fibrillen stellenweise stark auseinandergewichen sind. In den Fibrillenquerschnitten sind die Myosin-Filamente als schwarze Punkte zu sehen, umgeben von Actin-Filamenten geringerer Durchmesser. An der Schmalseite der Zelle (im Querschnitt als Spitze) ist durch das versetzte Auftreten der Fibrillenquerschnitte noch zu erkennen, daß jeder Zellenflachseite eine Reihe von Fibrillen zuzuordnen ist.

Ein Vergleich von nicht glycerinierten und glycerinierten Zellen auf elektronenmikroskopischer Ebene macht deutlich, daß die auffälligste durch die Glycerinbehandlung hervor-

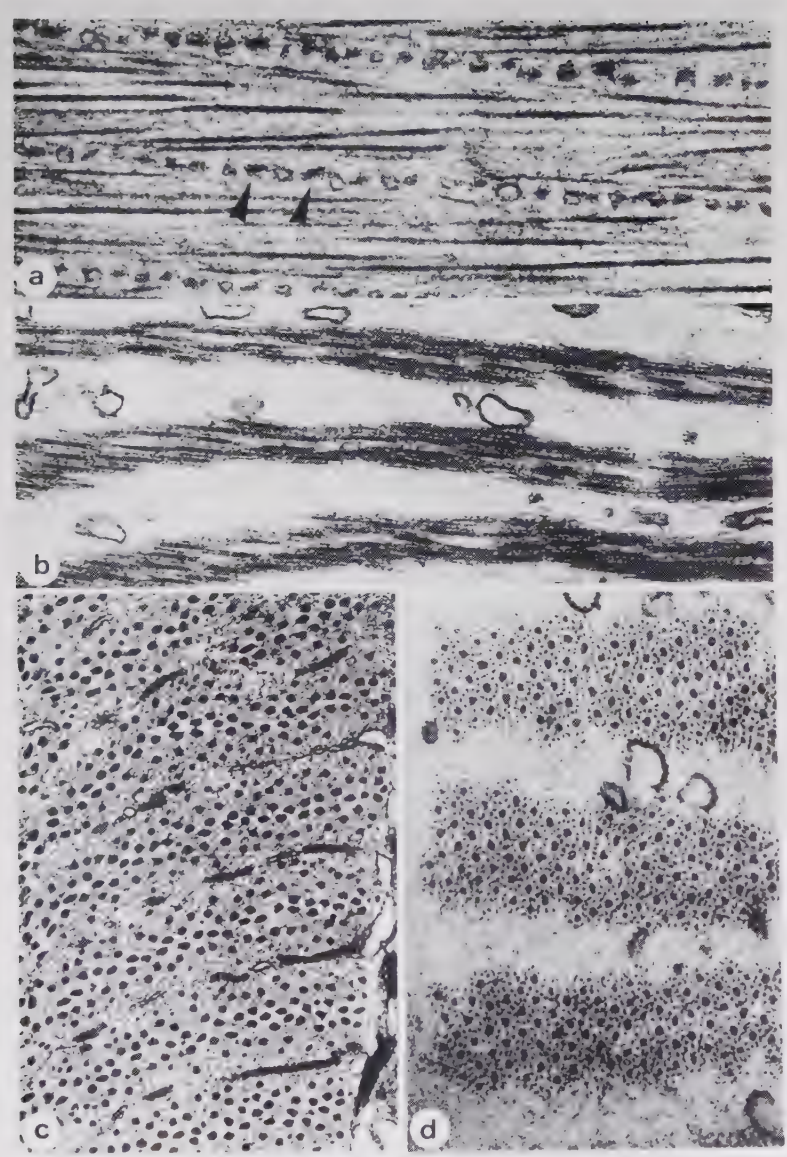
Abb. 9: Elektronenmikroskopische Aufnahme eines Querschnitts durch eine glycerinierte Muskelzelle. Der Querschnitt zeigt deutlich die lockere Packung der an der Zellperipherie liegenden bandförmigen Fibrillen. Vergrößerung: x 32.000.

gerufene Veränderung neben dem Auseinanderweichen der Fibrillen die Auflösung der Z-Elemente war. Abb. 10 a zeigt den Längsschnitt in der xz-Ebene (Schema Abb. 2 c) durch eine unbehandelte Muskelzelle. Die Myosin-Filamente sind als längliche Strukturen zu erkennen, umgeben von dünneren Actin-Filamenten. Im Querschnitt punktförmig sind die Z-Stäbe (Pfeile) und Tubuli des Sarkoplasmatischen Retikulums sichtbar. Im entsprechenden Schnitt durch eine glycerinierte Zelle (Abb. 10 b) sind keine Z-Stäbe mehr und nur noch blasig erscheinende Reste der Tubuli des Sarkoplasmatischen Retikulums zu sehen. Deutlich auseinandergewichen sind die längsgeschnittenen Fibrillen, die aus Actin- und Myosin-Filamenten bestehen. Die Auflösung der Z-Stäbe durch die Glycerinbehandlung wird auch aus vergleichenden Querschnitten in der xy-Ebene deutlich. In Abb. 10 c sind sie in ihrer Längsausdehnung zwischen den einzelnen quergeschnittenen Fibrillen sichtbar, wohingegen sie bei der glycerinierten Zelle (Abb. 10 d) nicht mehr zu entdecken sind.

Weiterhin wird aus den vergleichenden elektronenmikroskopischen Untersuchungen deutlich, daß die Anordnung der Actin- und Myosin-Filamente, insbesondere ihre Anordnung parallel zur Faserlängsachse weitgehend erhalten geblieben ist, was aus den Längsschnitten in Abb. 10 a und b hervorgeht. Beim Vergleich der Querschnitte (Abb. 9, 10 c und d) fällt auf, daß im glycerinierten Zustand die Anordnung der Actin-Filamente um die Myosin-Filamente herum eher noch regelmäßiger erscheint.

Durch die feinstrukturellen Untersuchungen konnte gezeigt werden, daß die durch Glycerinierung isolierten Fibrillen der Regenwurmmuskelzellen keine Z-Elemente mehr besaßen. Rückblickend auf die bereits demonstrierte Kontraktionsfähigkeit dieser Fibrillen stellt sich die Frage nach dem hier wirksamen Kontraktionsmechanismus.

Abb. 10: Elektronenmikroskopische Aufnahmen zum feinstrukturellen Vergleich von glycerinierten (b und d) und unglycerinierten (a und c) Muskelzellen des Regenwurms im Längs- (a und b) und Querschnitt (c und d). Die Pfeile in (a) bezeichnen die Z-Stäbe, die mit den Tubuli des SR alternieren, und die in (b) verschwunden sind. Beachtenswert ist die regelmäßige Anordnung der Filamente im Querschnitt der glycerinierten Zelle (d). Vergrößerung: (a, b und c) x 40.000; (d) x 80.000.

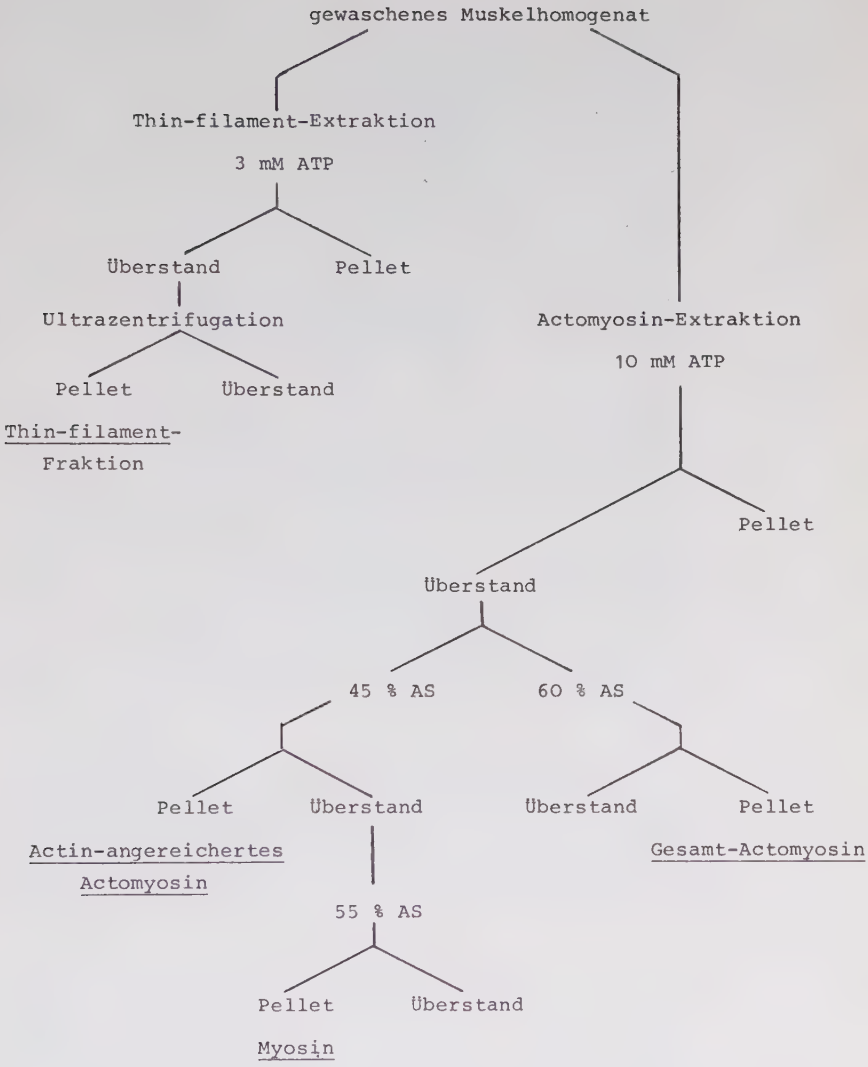

a
b
c
d

2. Das Actomyosin-System

2.1 Isolierung und allgemeine Eigenschaften

Zur Isolierung der kontraktilen Proteine der Regenwurmmuskulatur war es nötig, für diesen Muskel geeignete Methoden zu entwickeln. Im Vergleich mit den kontraktilen Proteinen der quergestreiften Skelettmuskulatur liegen die entsprechenden Komponenten des Regenwurmmuskels in einem anderen Mengenverhältnis vor und haben andere Löslichkeitseigenschaften. Dies ist mit begründet durch die strukturelle Organisation der schräggestreiften Muskulatur. Beim quergestreiften Skelettmuskel sind durch die Verankerung der Actin-Filamente an den Z-Scheiben zur Gewinnung des Actins lange Extraktionszeiten und hohe Salzkonzentrationen erforderlich, und das Myosin dieses Muskels wird als erstes aus dem Filament-Gerüst herausgelöst. Dahingegen wird beim schräggestreiften Muskel bereits zu Anfang und bei niedriger Salzkonzentration eine Fraktion von Actin-Filamenten extrahiert. Ebenso wie bei der Glycerinierung der Zellen (vgl. Kap. III. 1.2) zeigte sich also auch bei diesen Isolierungsverfahren, daß der Zusammenhalt der Muskelstrukturen im Bereich der Z-Stäbe äußerst labil ist.

Hinsichtlich der Extraktionseigenschaften der Strukturproteine des schräggestreiften Muskels ergeben sich demnach eher Ähnlichkeiten mit der glatten Vertebratenmuskulatur oder den glatten Schalenadduktormuskeln einiger Mollusken. Eine so weitgehende Trennung von Actin- und Myosin-Filamenten, wie für manche Molluskenmuskeln beschrieben (Szent-Györgyi et al., 1971), wurde allerdings bei der Regenwurmmuskulatur nicht erreicht. Es war aber möglich, durch eine Modifizierung dieser Methode eine Fraktion nativer Actin-Filamente (Thin-filament-Fraktion) zu gewinnen. Wie im Schema auf S. 39 angegeben, wurde das gewaschene Muskelhomogenat zur Präparation der Thinfilament-Fraktion mit einer ATP-haltigen Lösung unter


gewaschenes Muskelhomogenat
Thin-filament-Extraktion
3 mM ATP
Überstand
Pellet
Ultrazentrifugation
Pellet
Überstand
Thin-filament-Fraktion
Actomyosin-Extraktion
10 mM ATP
Pellet
Überstand
45 % AS
60 % AS
Pellet
Überstand
Actin-angereichertes Actomyosin
Überstand
Pellet
Gesamt-Actomyosin
55 % AS
Pellet
Überstand
Myosin

Dissoziation von Actin und Myosin extrahiert. Hierbei wurde im Gegensatz zu der von Szent-Györgyi et al. (1971) angegebenen Methode ganz auf die Zugabe von KCl verzichtet, was zu einer Verminderung der Myosin-Verunreinigungen im Extrakt führte. Ebenso wurde kein EDTA verwendet, um die dadurch begünstigte Dissoziation der leichten Ketten des Myosins und somit ihre Extraktion zu verhindern. Weiterhin wurden die dünnen Filamente aus dem Extrakt durch Ultrazentrifugation bei Anwesenheit von zusätzlichem ATP sedimentiert, um neben dem Actin selbst möglichst nur die tatsächlich dort gebundenen Proteine zu erhalten.

Frisch präparierte Thin filaments zeigten in der SDS-PAGE das in Abb. 11 a dargestellte Bandenmuster. Unter der Bande des Actins (MG 42.000), welches den Hauptproteinanteil ausmacht, sind Banden des Tropomyosin (s.u.) sichtbar. Proteinkomponenten mit niedrigeren Molekulargewichten werden z. T. als am Actin lokalisierte regulatorische Proteine gedeutet (vgl. Lehman et al., 1972; s. Kap. III. 4.). Im Verlauf der Untersuchungen stellte sich heraus, daß die Fraktionen nativer Actin-Filamente sehr anfällig für proteolytische Zersetzung waren. Oft war schon nach etwa 24 Stunden ein Verlust der funktionellen Aktivität (Ca-Sensitivität, s.u.) eingetreten. In der SDS-PAGE von ein bis drei Tage alten Thin-filament-Fraktionen war die Bande bei 24.000 sehr schwach geworden und im Molekulargewichtsbereich zwischen 20.000 und 17.000 hatten sich Proteine, wahrscheinlich proteolytische Fragmente, angereichert. Bei vergleichenden Untersuchungen ergab sich, daß ein Lösen der durch Ultrazentrifugation erhaltenen Pellets in 30 mM Tris (pH ca. 9,0) mit erst anschließender Neutralisierung des Homogenats durch HCl-Zugabe (vgl. Kap. II. 2.1) eine wesentlich stabilere Fraktion von Thin filaments ergab, welche noch nach drei Tagen regulatorisch aktiv war.

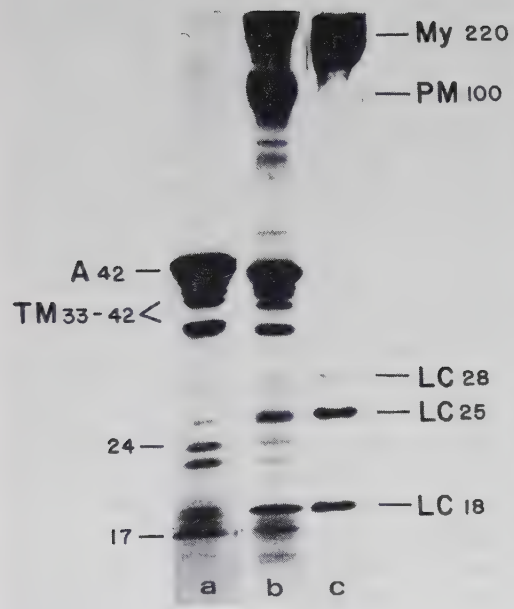


Abb. 11: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Proteinfraktionen isoliert aus Regenwurmmuskulatur. (a) Thinfilament-Fraktion; (b) Actomyosin, aus dem Extrakt durch 60 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung gefällt, sog. Gesamt-Actomyosin; (c) Myosin. Die Zahlen x 10^3 geben die Molekulargewichte an. A, Actin; LC, leichte Ketten des Myosins; My, schwere Ketten des Myosins; PM, Paramyosin; TM, Tropomyosin.

Actomyosin wurde aus dem Muskelhomogenat entweder durch hohe Salzkonzentrationen (0,5 M KCl oder NaCl) oder durch 10 mM ATP extrahiert. Während die Extraktion bei hoher Ionenstärke u.a. durch das Auflösen der Myosin-Paramyosin-Filamente ohne Dissoziation des Myosins vom Actin ermöglicht

wird, führt bei Anwesenheit von 10 mM ATP eine Dauererschlaffung zur Dissoziation von Actin und Myosin und damit zur Extraktion. Die letztere Methode wurde für die Actomyosin-Extraktion aus glatter Vertebratenmuskulatur beschrieben (Sobieszek & Bremel, 1975) und entsprechend bei der Regenwurmmuskulatur aufgrund der resultierenden hohen Proteinausbeute bevorzugt angewandt (s. Schema S. 39). Für Untersuchungen bei denen das Actomyosin mit einem annähernd dem natürlichen Zustand entsprechenden Mengenverhältnis der einzelnen Proteine vorliegen sollte, wurde das gesamte extrahierte Protein durch 60 %ige Ammoniumsulfatsättigung gefällt (Abb. 11 b). Zur Präparation von Actin-angereichertem Actomyosin und von Myosin wurde eine Ammoniumsulfat-Fraktionierung vorgenommen. Bei dieser Actin-Myosin-Trennung begünstigte die noch in der Lösung vorliegende hohe ATP-Konzentration zum Zeitpunkt der Ammoniumsulfat-Zugabe die Gewinnung eines relativ Actin-freien Myosins (Abb. 11 c). Dieses verblieb nach der Fällung des Actin-angereicherten Actomyosins bei 45 %iger Ammoniumsulfat-Sättigung im Überstand und konnte durch 55 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung präzipitiert werden. Das bei 45 %iger Ammoniumsulfat-Sättigung gefällte Actin-angereicherte Actomyosin stellte meist das Ausgangsmaterial für die Präparation von Tropomyosin und Troponin dar. Das bei 60 %iger Ammoniumsulfat-Sättigung gefällte sog. 'Gesamt-Actomyosin' unterschied sich von dem bei der Fraktionierung gewonnenen Actin-angereicherten Actomyosin hauptsächlich im Myosin-Gehalt, welcher bei letzterem erwartungsgemäß geringer war.

In der SDS-PAGE werden die Hauptbanden des Actomyosins (Abb. 11 b) durch die schweren Ketten des Myosins, durch Paramyosin und durch Actin gebildet. Die schweren Ketten des Myosins haben ein Molekulargewicht von 440.000 und im Gel sind die monomeren Einzelketten mit einem Molekulargewicht von 220.000 als oberste Bande sichtbar.

Das Paramyosin hat ein Molekulargewicht von etwa 200.000 und seine Polypeptidketten bilden eine Bande im Molekulargewichtsbereich von 100.000. Die Actin-Monomere haben ein Molekulargewicht von 42.000. Zu den Proteinen mit niedrigeren Molekulargewichten gehören die schon bei der Thinfilament-Fraktion angetroffenen am Actin lokalisierten regulatorischen Komponenten, sowie die leichten Ketten des Myosins mit den Molekulargewichten von 28.000, 25.000 und 18.000.

Zur Schätzung des molaren Verhältnisses der Hauptproteinanteile des Regenwurm-Actomyosins wurde die SDS-PAGE verschiedener Präparationen des 'Gesamt-Actomyosins' herangezogen. Die angefärbten Banden wurden nach der Methode von Fenner et al. (1975) extrahiert und der Proteingehalt wurde photometrisch ermittelt. In guter Übereinstimmung ergab die Messung verschiedener Gele ein molares Verhältnis von Myosin : Actin : Paramyosin von 1 : 9 : 3. Diese Werte können jedoch nur als grobe Schätzung angesehen werden, da, wie aus der zwei-dimensionalen Elektrophorese von Actomyosin (Abb. 18) ersichtlich ist, besonders im Molekulargewichtsbereich des Actins andere Proteinkomponenten vorliegen.

2.2 Untersuchungen zur Ca-Regulation des Actomyosins

2.2.1 Die Ca-Abhängigkeit des Actomyosins

Von nahezu allen bisher untersuchten Actomyosin-Systemen ist bekannt, daß ihre ATPase von der Anwesenheit von Ca-Ionen im mikromolaren Bereich abhängig ist. Um den Ca-Konzentrationsbereich zu ermitteln, in welchem die Actin-Myosin-Interaktion im isolierten Actomyosin der Regenwurmmuskulatur reguliert wird, wurde die ATPase-Aktivität einer rohen Actomyosin-Fraktion (Gesamt-Actomyosin) in Abhängigkeit von der Ca-Ionenkonzentration ermittelt (Abb. 12).

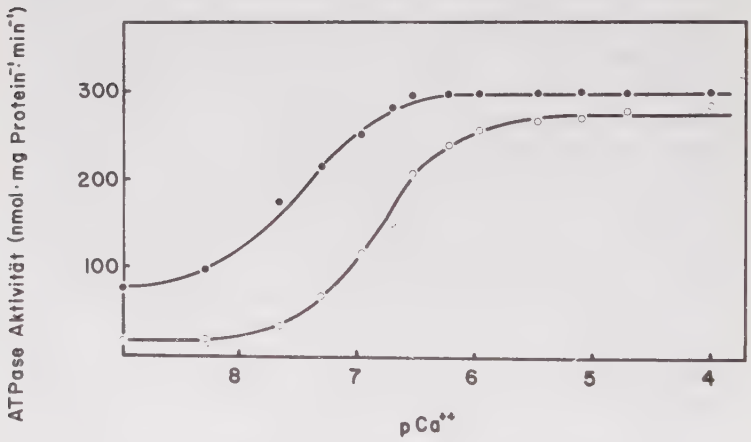


Abb. 12: Die Ca-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität des Actomyosins aus Regenwurmmuskulatur bei zwei verschiedenen KCl-Konzentrationen. Auf der Abszisse ist der negative Logarithmus der eingesetzten Ca-Konzentration aufgetragen. Die Aktivitäten bei 20 und 80 mM KCl sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentration an Gesamt-Actomyosin betrug 1,0 mg/ml.

Neben der unter Standardbedingungen bei 20 mM KCl durchgeführten Messung, wurde die KCl-Konzentration auf 80 mM erhöht. Die resultierenden in Abb. 12 dargestellten Kurven zeigen beide einen sigmoiden Verlauf. Mit abnehmender Ca-Konzentration wurde die ATPase-Aktivität um bis zu 75 % bzw. 95 % gehemmt. Unter Standardbedingungen trat die halbmaximale Hemmung bei etwa $3,5 \times 10^{-8}$ M Ca ein. Eine Erhöhung der Ionenstärke hatte nur geringen Einfluß auf die maximale ATPase-Aktivität. Der kritische Ca-Konzentationsbereich, in welchem die Hemmung des Systems erfolgte, wurde jedoch drastisch verschoben. Die halbmaximale Hemmung erfolgte erst bei ca. $1,5 \times 10^{-7}$ M Ca.

Abgesehen von dem Effekt der KCl-Konzentration, auf welchen später noch Bezug genommen wird, geht aus dieser Darstellung hervor, daß das Regenwurm-Actomyosin in einem Ca-Konzentrationsbereich reguliert wird, in welchem auch bei anderen Muskeln die Ca-Konzentration über das Sarkoplasmatische Retikulum verändert wird.

2.2.2 Indirekter Nachweis dualer Regulation

Durch den kompetitiven Actin- bzw. Myosin-Bindungstest lassen sich Hinweise auf die Art der Ca-Regulation eines Actomyosins erhalten, d.h. ob Actin-gekoppelte, Myosin-gekoppelte oder duale Regulation vorliegt. Dieses indirekte Verfahren hat den Vorteil, daß mit rohen Actomyosin-Fraktionen, die mit einem Minimum an evtl. verfälschenden präparativen Methoden herzustellen sind, gearbeitet werden kann. Der kompetitive Actin-Bindungstest basiert darauf, daß sich das Ca-sensitive Actin des zu untersuchenden Actomyosins durch desensibilisiertes Actin ersetzen läßt, welches auch bei Abwesenheit von Ca-Ionen in der Lage ist, Myosin zu aktivieren.

Entsprechendes gilt beim kompetitiven Myosin-Bindungstest. Eine Voraussetzung für derartige Tests ist, daß sich die Komponenten der zu untersuchenden Systeme mit den nicht Ca-sensitiven Proteinen - meist aus dem Kaninchen-Skelettmuskel stammend - hybridisieren lassen.

Der kompetitive Actin- bzw. Myosin-Bindungstest wurde mit dem Regenwurm-Actomyosin bei verschiedenen Konzentrationen von desensibilisiertem Actin bzw. HMM [+)] der Kaninchen-Skelettmuskulatur durchgeführt. Die ermittelten ATPase-Aktivitäten für die Gewichtsverhältnisse von Regenwurmactomyosin : Skelettmuskelprotein von 1 : 0,5 und 1 : 1 sind in Tabelle 1 dargestellt. Durch den Zusatz von Kaninchen-Actin stieg die ATPase-Aktivität des Actomyosins von 78 auf bis zu 131 nmol P_i x mg Actomyosin^{-1} x min^{-1} an, woraus hervorgeht, daß eine Hybridisierung der Proteine aus Regenwurm- und Skelettmuskel möglich ist, da das Regenwurm-Myosin durch Skelettmuskel-Actin aktiviert wurde. Die Ca-Sensitivität blieb unverändert hoch, was auf Ca-regulatorisch aktive Komponenten am Regenwurm-Myosin schließen ließ. Die Steigerung der ATPase-Aktivität beim Zusatz von HMM auf 231 nmol P_i x mg Actomyosin^{-1} x min^{-1} zeigte, daß das Actin der Regenwurmmuskulatur in der Lage war, Skelettmuskel-HMM zu aktivieren. Die verbleibende Ca-Sensitivität ist auf regulatorische Proteine am Regenwurm-Actin zurückzuführen. Nach diesem Testergebnis konnte angenommen werden, daß das Actomyosin der Regenwurmmuskulatur dual reguliert ist. Beide Systeme sind offenbar in ähnlichem Maße zur Regulation der Actomyosin-ATPase-Aktivität befähigt.

[+)] HMM = Heavy Meromyosin, Spaltprodukt des Myosins

	Mg-ATPase Aktivität (nmol P_i min^{-1} mg Actomyosin^{-1})		Ca-Sensitivität
	Ca^{2+}	EGTA	%
Actomyosin (0,4 mg)	78	10	87
+ Actin (0,2 mg)	107	15	86
+ Actin (0,4 mg)	131	16	88
+ HMM (0,2 mg)	225	38	83
+ HMM (0,4 mg)	231	69	70

Hinweis auf eine doppelte Regulation des Regenwurm-Actomyosins durch den kompetitiven Actin- und Myosin-Bindungs-Test mit HMM und unreguliertem Actin aus Kaninchen-Skelettmuskulatur.

Tab. 1

2.2.3 Direkter Nachweis dualer Regulation

Im Gegensatz zum indirekten Nachweis dualer Regulation steht der direkte Nachweis durch die Hybridisierung der isolierten Komponenten des zu untersuchenden Actomyosins mit den entsprechenden nicht Ca-sensitiven Skelettmuskelproteinen. Weiterhin sind nach derartigen Experimenten Aussagen über Eigenschaften und Effektivität der einzelnen Regulationssysteme möglich.

In Abb. 13 ist die Wirkung ansteigender Mengen einer Regenwurm-Thin-filament-Fraktion auf die ATPase-Aktivität von Skelettmuskel-HMM dargestellt. Die starke Akti-

vierung der HMM-ATPase durch das Actin des Regenwurms bestätigt eindeutig die schon nach dem kompetitiven Actin-Bindungstest angenommene Hybridisierbarkeit der Proteine.

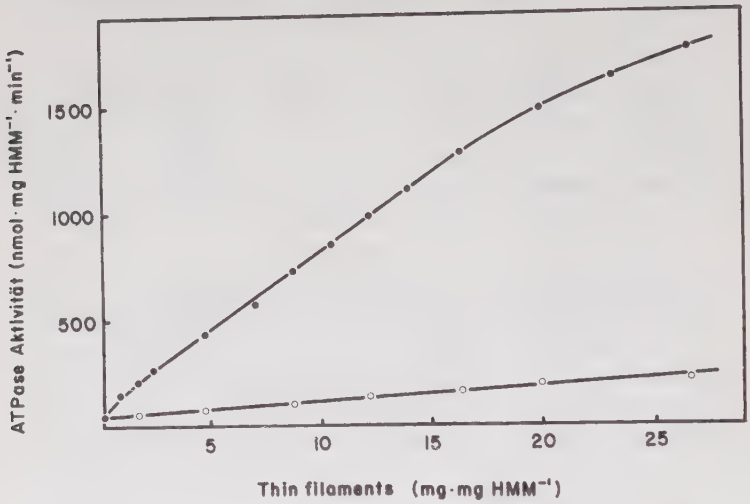


Abb. 13: Die Aktivierung der ATPase von HMM des Kaninchen-Skelettmuskels durch native Actin-Filamente (Thin filaments) der Regenwurmmuskulatur. Die Aktivitäten in An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentration von HMM betrug 0,3 mg/ml.

Die ATPase-Aktivität stieg linear mit der Thin-filament-Konzentration ohne einen Sättigungswert zu erreichen. Auch bei einem Gewichtsverhältnis von Actin-Filamenten : HMM von mehr als 25 : 1 wurde noch eine ansteigende Tendenz in der Aktivierung festgestellt. Die Aktivität, welche die Thin-filament-Fraktion aufgrund von leichten Myosin-Verunreinigungen hatte, wurde von den gemessenen Aktivitäten abgezogen. Die Aktivierung der HMM-ATPase durch die nativen Actin-Filamente des Regenwurms zeigte eine starke Ca-Abhängigkeit. Bei Entzug von Ca-Ionen durch EGTA wurde die Acto-HMM-ATPase um bis zu 85 % gehemmt. Diese Ca-Sensi-

tivität des hybriden Systems konnte nur durch am Regenwurm-Actin lokalisierte Proteine hervorgerufen worden sein, da das HMM der Skelettmuskulatur unter den gegebenen Bedingungen Ca-regulatorisch inaktiv ist.

Das isolierte Myosin der Regenwurmmuskulatur zeigte unter den Standardbedingungen der Messungen eine sehr niedrige ATPase-Aktivität von etwa 30 nmol P_i x mg Myosin^{-1} x min^{-1}. Dies bestätigt die schon durch die SDS-PAGE erhaltene Annahme, daß es relativ frei von Actin-Verunreinigungen war. Die Mg-aktivierte ATPase des Myosins ließ sich durch Zugabe von Actin der Kaninchenmuskulatur um mehr als das zehnfache steigern. Die 1/2-maximale Aktivierung lag bei 0,5 mg Actin/1 mg Myosin (Abb. 14).

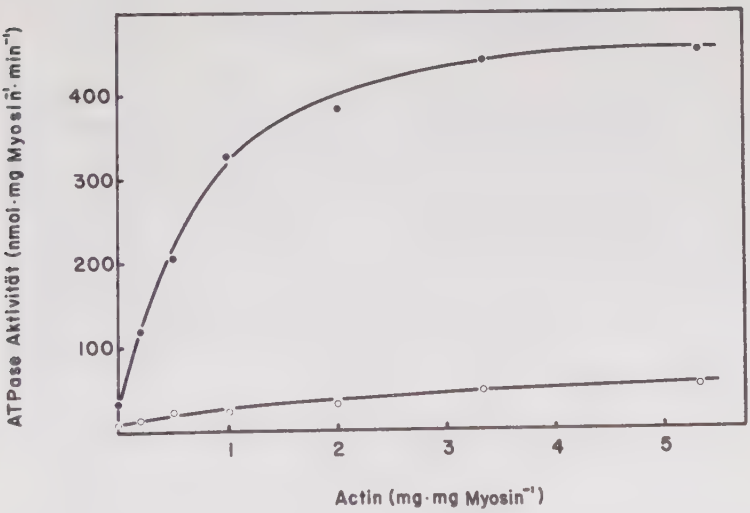


Abb. 14: Die Aktivierung der ATPase des Regenwurm-Myosins durch Actin des Kaninchen-Skelettmuskels. Die Aktivitäten in An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentration von Myosin betrug 0,3 mg/ml.

Im Rahmen der Bestimmung des Ca-Regulationsmodus ist die fast totale Hemmung der ATPase-Aktivität in Anwesenheit von EGTA ausschlaggebend. Bereits bei 1/2-maximaler Aktivierung wird die Myosin-ATPase-Aktivität durch Ca-Ionenentzug um mehr als 80 % gehemmt. Bei maximaler Aktivierung ergibt sich eine Ca-Sensitivität von über 90 %. Das gereinigte Actin der Skelettmuskulatur war frei von regulatorischen Proteinen. Die Ca-abhängige Regulation der Actin-Myosin-Interaktion dieses hybriden Systems konnte also nur durch am Regenwurm-Myosin lokalisierte Faktoren bewirkt worden sein (vgl. D'Haese, 1980).

2.2.4 Untersuchungen zur Ca-Abhängigkeit der Actin- und Myosin-gekoppelten Regulation

Im Vorangegangenen wurde die Ca-regulatorische Potenz des Actin- und des Myosin-gekoppelten Regulationssystems in Form der Ca-abhängigen Actin-Aktivierung gezeigt. Weiterhin wurde versucht, Unterschiede zwischen den beiden Regulationssystemen in Bezug auf mögliche Abweichungen ihrer Affinität für Ca und die Anzahl ihrer Ca-Bindungsstellen zu finden. Dazu wurde der Ca-Konzentrationsbereich ermittelt, in welchem sie die Actin-Myosin-Interaktion in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration regulieren.

Hierzu wurde natives Actin der Regenwurmmuskulatur mit Myosin der Skelettmuskulatur des Kaninchens und Regenwurm-Myosin mit Kaninchen-Actin hybridisiert. Hierbei war das Gewichtsverhältnis Actin : Myosin wie 2 : 1, was einem molaren Verhältnis von 5 : 1 entspricht. Wie bei der Messung der Ca-Abhängigkeit des Gesamt-Actomyosins (Abb. 12) wurde die KCl-Konzentration neben dem für

die Standardmessungen üblichen Wert von 20 mM KCl auch auf 80 mM erhöht. Diese Art der Ermittlung der Ca-Abhängigkeit der hybriden und synthetischen (s.u.) Systeme bei zwei verschiedenen KCl-Konzentrationen wurde mehrmals mit verschiedenen Präparationen von Regenwurmproteinen durchgeführt.

Abb. 15 zeigt, daß ein hybrides System, bestehend aus den nativen Actin-Filamenten des Regenwurms und Kaninchen-Myosin, bei 20 mM KCl in einem sehr engen Ca-Konzentrationsbereich von ca. 3×10^{-8} bis 10^{-7} M reguliert wurde, woraus ein sehr steiler Kurvenverlauf resultierte.

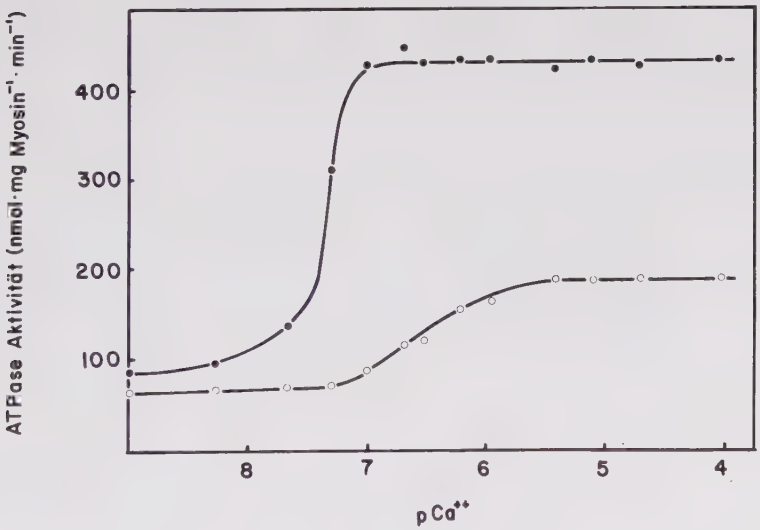


Abb. 15: Die Ca-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität eines hybridisierten Actomyosins bestehend aus nativen Actin-Filamenten der Regenwurmmuskulatur und Myosin des Kaninchen-Skelettmuskels bei zwei verschiedenen KCl-Konzentrationen. Auf der Abszisse ist der negative Logarithmus der eingesetzten Ca-Konzentration aufgetragen. Die Aktivitäten bei 20 und 80 mM KCl sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentration der Thin filaments und des Myosins waren 1,0 bzw. 0,5 mg/ml.

D.h. durch eine relativ geringfügige Änderung der Ca-Konzentration stieg die ATPase-Aktivität stark an und zwar von etwa 90 auf über 400 nmol P_i x mg Myosin^{-1} x min^{-1}. Bei 80 mM KCl war die Aktivität stark gehemmt. Sie stieg nur noch auf etwa 180 nmol P_i x mg Myosin^{-1} x min^{-1} an und dieser Anstieg erfolgte über einen breiten Ca-Konzentrationsbereich von etwa 5 x 10^{-8} bis 5 x 10^{-6} M. Auch die Ca-Sensitivität war bei dieser KCl-Konzentration geringer.

In Abb. 16 ist die Reaktion zwei verschiedener Myosin-Präparationen in Kombination mit Kaninchen-Actin dargestellt. Hieraus geht hervor, daß aus der Regenwurmmuskulatur ein Myosin isoliert werden konnte, welches in ähnlicher Weise wie die Thin-filament-Fraktion auf Änderungen der Ca-Konzentration in Abhängigkeit von der KCl-Konzentration reagierte (Kreise in Abb. 16). D.h. bei 20 mM KCl ergab sich durch eine starke Aktivierung der ATPase-Aktivität von etwa 90 auf über 400 nmol P_i x mg Myosin^{-1} x min^{-1} innerhalb eines engen Ca-Konzentrationsbereiches von etwa 4 x 10^{-8} bis 1,5 x 10^{-7} M ein steiler Kurvenverlauf, wohingegen sich bei 80 mM KCl die Aktivität nur noch bis etwa 180 nmol P_i x mg Myosin^{-1} x min^{-1} mit einem flachen Anstieg der Kurve zwischen ca. 4 x 10^{-8} und 10^{-6} M Ca steigerte.

Mit der gleichen Methode wurden aber auch Myosin-Fraktionen gewonnen, durch deren Verwendung das hybride System ein ganz anderes Verhalten zeigte. Die Aktivierung der ATPase zeigte sich dann weitgehend unabhängig von der KCl-Konzentration (Dreiecke in Abb. 16).
Die Kurve stieg zwar etwas weniger steil an, d.h. der Anstieg erfolgte über einen etwas breiteren Ca-Konzentrationsbereich von ca. 9 x 10^{-8} bis 10^{-6} M, doch es wurde eine maximale ATPase-Aktivität von 390 nmol P_i x mg Myosin^{-1} x min^{-1} gemessen.

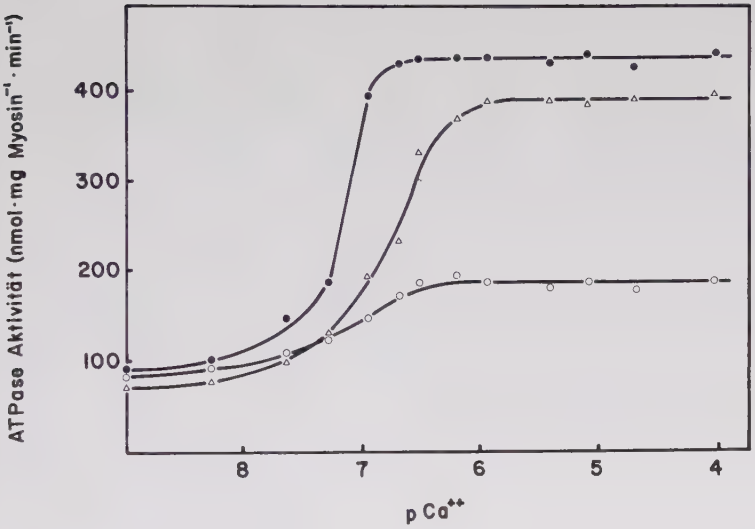


Abb. 16: Die Ca-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität eines hybridisierten Actomyosins bestehend aus Actin der Kaninchen-Skelettmuskulatur und Myosin der Regenwurm-muskulatur bei zwei verschiedenen KCl-Konzentrationen. Auf der Abszisse ist der negative Logarithmus der eingesetzten Ca-Konzentration aufgetragen. Kreise und Dreiecke bezeichnen zwei verschiedene Myosin-Präparationen. Die Aktivitäten bei 20 und 80 mM KCl sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentrationen des Actins und des Myosins waren 1,0 bzw. 0,5 mg/ml.

Wurde ein synthetisches Actomyosin bestehend aus den nativen Actin-Filamenten und dem Myosin des Regenwurms unter denselben Bedingungen untersucht (Abb. 17), so bot sich ein ähnliches Bild wie in Abb. 16. D.h. es war allein durch die Variabilität der Myosin-Komponente geprägt, welche auch in diesem "Regenwurm-internen" System sowohl abhängig als auch unabhängig von der KCl-Konzentration aktivierbar vorliegen konnte.

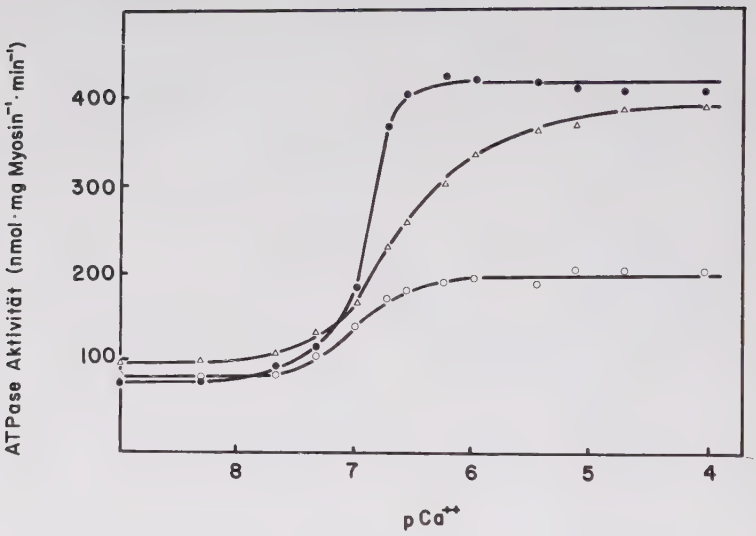


Abb. 17: Die Ca-Abhängigkeit der ATPase-Aktivität eines synthetischen Actomyosins bestehend aus nativen Actin-Filamenten und Myosin des Regenwurms bei zwei verschiedenen KCl-Konzentrationen. Auf der Abszisse ist der negative Logarithmus der eingesetzten Ca-Konzentrationen aufgetragen. Kreise und Dreiecke bezeichnen zwei verschiedene Myosin-Präparationen. Die Aktivitäten bei 20 und 80 mM KCl sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentration der Thin filaments und des Myosins waren 1,0 bzw. 0,5 mg/ml.

Nach dem Vergleich verschiedener Protein-Präparationen kann festgestellt werden, daß das Verhalten des Actomyosins, welches als Regenwurm-Komponente die nativen Actin-Filamente enthielt, immer gleich war, wohingegen das System, in welchem Regenwurm-Myosin vorlag, zwei extrem unterschiedliche - von der jeweiligen Myosin-Präparation abhängige - Reaktionen auf die KCl-Konzentration zeigte (Abb. 16 und 17). Die Verschiebung des Bereichs der kritischen Ca-Konzentration in Richtung höherer Konzentrationen bei 80 mM KCl (vgl. Abb. 12) wurde bei allen synthetischen Actomyosinen festgestellt.

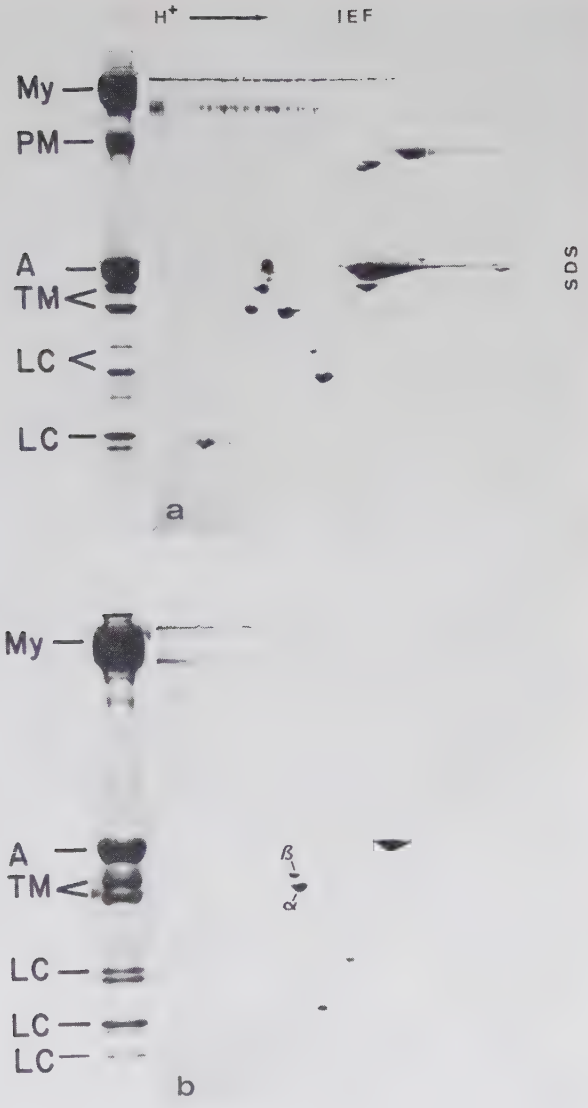
3. Charakterisierung von Tropomyosin

Die Isolierung und Charakterisierung regulatorischer Proteine beschränkte sich im Rahmen dieser Arbeit auf die am Actin lokalisierten Komponenten. Hierbei stand zunächst das Tropomyosin im Vordergrund. Seine Existenz im Regenwurmmuskel war insofern zu erwarten, als daß Tropomyosin bisher in allen untersuchten Muskelgeweben unabhängig vom Regulationsmodus des betreffenden Actomyosins nachgewiesen werden konnte. Es wurde auch in vielen nicht muskulären Zellen gefunden. Es ist bekannt, daß Tropomyosin, unabhängig von seiner Wirkung innerhalb des Ca-Regulationssystems die Interaktion von Actin und Myosin beeinflussen kann (s. Kap. III. 3.3.2). Unterschiede zwischen Tropomyosinen verschiedener Herkunft in Molekulargewicht, Aggregationsverhalten, Dissoziation der Untereinheiten und vor allem in ihrer Wirkung auf die Actomyosin-ATPase einerseits und zum anderen die fundamentale Rolle, die Tropomyosin innerhalb der Actin-gekoppelten Ca-Regulation der Kontraktion spielt, geben Veranlassung zu einer Charakterisierung des Tropomyosins der dual regulierten Muskulatur des Regenwurms.

3.1 Isolierung und allgemeine Eigenschaften von Tropomyosin

Das Ausgangsmaterial für die Präparation von Tropomyosin war entweder das gesamte Muskelhomogenat oder das durch 45 %ige Ammoniumsulfatsättigung aus dem Rohextrakt ausgefällte Actin-angereicherte Actomyosin (vgl. S. 39). Abb. 18 zeigt vergleichend das Actomyosin der Regenwurmmuskulatur (Abb. 18 a) und das des Kaninchen-Skelettmuskels (Abb. 18 b) nach Auftrennung in der zwei-dimensionalen

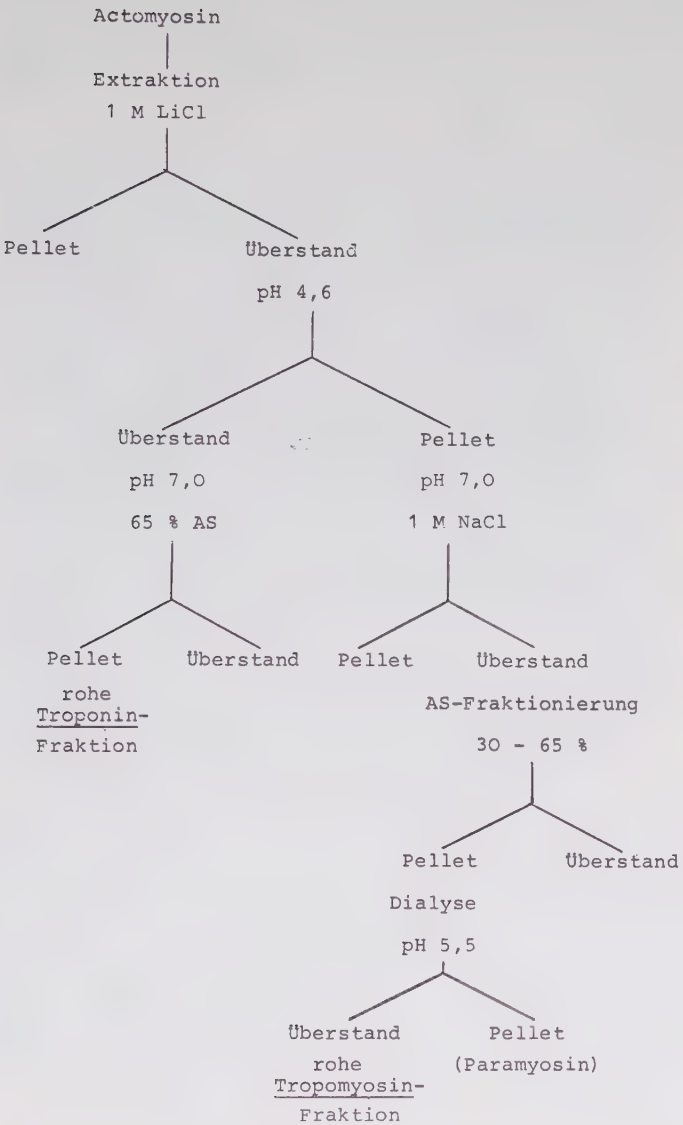
Abb. 18: Vergleich der zwei-dimensionalen Elektrophorese des isolierten Actomyosins der Regenwurmmuskulatur (a) und der Kaninchen-Skelettmuskulatur (b). H^+ markiert den positiven Pol während der ersten Dimension, der isoelektrischen Fokussierung (IEF); die zweite Dimension erfolgte im SDS-PAGE-System. Die links neben den Gelplatten abgebildeten Gelstreifen stellen die Referenz dar, d.h. die Auftrennung der jeweiligen Probe nur im SDS-PAGE-System. A, Actin; LC, leichte Ketten des Myosins; My, Myosin; PM, Paramyosin; TM, Tropomyosin; α und β bezeichnen die jeweiligen Polypeptidketten des Skelettmuskel-Tropomyosins.


H+
IEF
My
PM
A
TM
LC
LC
SDS
a
My
A
TM
LC
LC
LC
ß
α
b

Elektrophorese. Das native Tropomyosin der Skelettmuskulatur hat ein Molekulargewicht von ca. 70.000 und besteht aus zwei Polypeptidketten, als α- und β-Tropomyosin bezeichnet, welche unter den dissoziierenden Bedingungen der Fokussierung in Harnstoff und der SDS-PAGE getrennt werden. Beide werden im pH-Bereich um 4,6 fokussiert und sind aufgrund leicht unterschiedlicher Mobilitäten in der SDS-PAGE als zwei Punkte im Molekulargewichtsbereich um 35.000 in der Gelplatte sichtbar. In dem entsprechenden pH- und Molekulargewichtsbereich sind nach Auftrennung des Actomyosins der Regenwurmmuskulatur in der zwei-dimensionalen Elektrophorese (Abb. 18 a) als auffallende Abweichung vier distinkte Punkte sichtbar.

Durch die auf S. 58 im Schema dargestellte Präparationsmethode wurde eine Rohfraktion von Tropomyosin erhalten, welche aus vier Hauptkomponenten bestand. Das Actomyosin wurde meist direkt mit 1 M LiCl extrahiert. Eine vorhergehende Behandlung mit Ethanol und Ether (Bailey, 1948) brachte bezüglich der Ausbeute und Reinheit keine offensichtlichen Vorteile. Durch isoelektrische Präzipitation bei pH 4,6 wurde Tropomyosin zusammen mit Paramyosin und denaturiertem Actin und Myosin gefällt. Bei 1 M NaCl und pH 7,0 gingen anschließend Tropomyosin und Paramyosin in Lösung. Der größte Teil des Paramyosins wurde durch Fraktionierung bei 35 - 65 %iger Ammoniumsulfat-Sättigung beseitigt. Weitere Paramyosin-Anteile wurden durch Dialyse des rohen Tropomyosins gegen niedrige Ionenstärke und pH 5,5 ausgefällt.

Die so erhaltene Rohfraktion von Tropomyosin zeigte in der SDS-PAGE (Abb. 19 a) neben schwachen Verunreinigungen von Paramyosin und Komponenten mit niedrigeren Molekulargewichten (25.000 - 17.000) Hauptbanden im Bereich 42.000 - 33.000. Bei weniger starker Beladung des Elektrophoresegels und längerer Laufzeit konnten vier Hauptbanden unter-


Actomyosin
Extraktion
1 M LiCl
Pellet
Überstand
pH 4,6
Überstand
pH 7,0
65 % AS
Pellet
Überstand
rohe
Troponin-
Fraktion
Pellet
pH 7,0
1 M NaCl
Pellet
Überstand
AS-Fraktionierung
30 - 65 %
Pellet
Überstand
Dialyse
pH 5,5
Überstand
rohe
Tropomyosin-
Fraktion
Pellet
(Paramyosin)

schieden werden, die auf folgende Molekulargewichte schliessen ließen: 42.000, 37.000, 34.000 und 33.000. Nach ihren Reinigungseigenschaften (isoelektrische Präzipitation bei pH 4,6) und ihrer Mobilität in der SDS-PAGE bestand Grund zu der Annahme, daß diese vier Komponenten den vier Punkten, welche in der zwei-dimensionalen Elektrophorese auftraten, entsprechen.

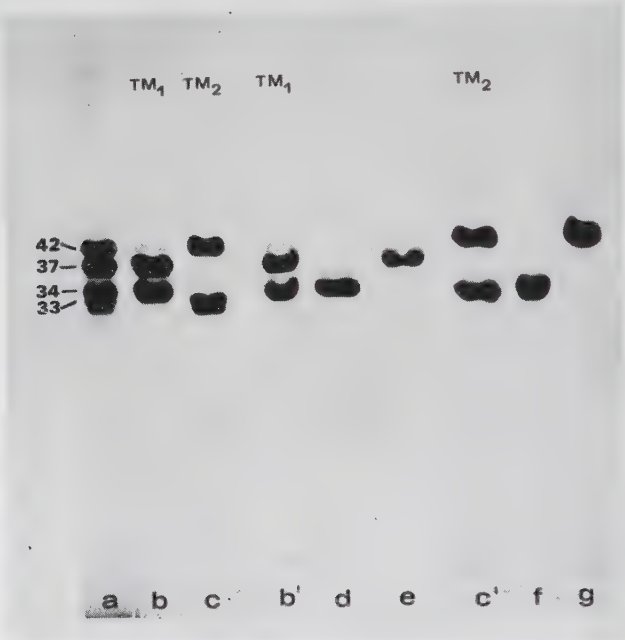


Abb. 19: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Tropomyosin-Fraktionen aus Regenwurmmuskulatur. (a-c) Auftrennung der Tropomyosin-Rohfraktion (a) in $Tropomyosin_1$ (b) und $Tropomyosin_2$ (c) durch DEAE-Chromatographie ohne Anwesenheit von Harnstoff (vgl. Abb. 20): (b) $Tropomyosin_1$, eluiert bei 350 mM KCl, (c) $Tropomyosin_2$, eluiert bei 300 mM KCl; (b'-e) Auftrennung von $Tropomyosin_1$ (b') in seine beiden Untereinheiten durch CM-Cellulose-Chromatographie in Anwesenheit von Harnstoff (vgl. Abb. 21): (d) eluiert bei 60 mM NaCl, (c) eluiert bei 70 mM NaCl; (c'-g) Auftrennung von $Tropomyosin_2$ (c') in seine beiden Untereinheiten durch DEAE-Chromatographie in Anwesenheit von Harnstoff (vgl. Abb. 22): (f) eluiert bei 155 mM Gdn-HCl, (g) eluiert bei 185 mM Gdn-HCl. Die Zahlen x 10^3 geben die Molekulargewichte an.

Die vier Untereinheiten schienen in etwa äquimolarem Verhältnis vorzuliegen. Dieser schon bei der Betrachtung der zwei-dimensionalen Elektrophorese entstehende Eindruck wurde durch Messung der an die Proteine gebundenen Farbstoffmenge bestätigt. Um den Bereich der Molekülgröße des nativen Regenwurm-Tropomyosins zu ermitteln, wurde eine Gelfiltration der Rohfraktion unter nicht dissoziierenden Bedingungen vorgenommen. Die Elutionsprofile von Kaninchen-Tropomyosin und Regenwurm-Tropomyosin waren identisch und ließen auf ein Molekulargewicht um 70.000 schließen. Dies galt als Hinweis darauf, daß die in der SDS-PAGE des Regenwurm-Tropomyosins sichtbaren vier Banden als Monomere etwa doppelt so großer Gesamtmoleküle anzusehen sein könnten.

Zur Beseitigung der Verunreinigungen und zur eventuellen Fraktionierung schien eine Ionenaustauscher-Chromatographie des rohen Tropomyosins sinnvoll. Aus Abb. 20 geht hervor, daß durch DEAE-Sepharose-Chromatographie neben der Reinigung eine Auftrennung des Rohtropomyosins in zwei Hauptfraktionen erfolge. Die im linearen KCl-Gradienten bei 300 mM KCl eluierte Fraktion enthielt die beiden Komponenten mit den Molekulargewichten von 42.000 und 33.000 (Abb. 19 b), während im Peak bei 350 mM KCl die Komponenten mit den Molekulargewichten von 37.000 und 34.000 gewonnen wurden(Abb. 19 c).

Diese zuletzt eluierte Fraktion (MG 37.000 und 34.000) wurde durch anschließende Untersuchungen eindeutig als Tropomyosin identifiziert (Ditgens et al., 1982). Da bisher das Auftreten von zwei dimeren Formen von Tropomyosin innerhalb des gleichen Muskeltyps einer Tierspezies nicht beschrieben worden ist, wurde die bei 350 mM KCl eluierte Proteinfraktion anfänglich nicht als Tropomyosin angesprochen.

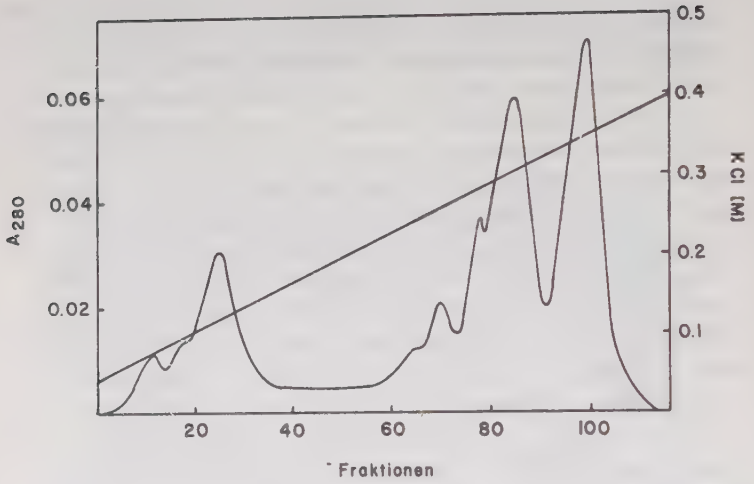


Abb. 20: Elutionsdiagramm einer DEAE-Sepharose-Chromatographie von Rohtropomyosin aus Regenwurmmuskulatur. 30 ml einer rohen Tropomyosin-Fraktion (5 mg/ml) wurden gegen Equilibrationspuffer (40 mM KCl, 10 mM EDTA-KOH, pH 6,3, 0,5 mM DTT, 100 mg/l Streptomycin) dialysiert und auf eine DEAE-Sepharose Cl 6B-Säule (2,5 x 23 cm) aufgetragen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 0,04 - 0,5 M KCl in 3000 ml bei einer Durchflußrate von 90 ml/h eluiert. Es wurden Fraktionen von 20 ml gesammelt.

In der folgenden Darstellung wird gezeigt, daß es sich bei dieser Fraktion ebenfalls um ein Tropomyosin-ähnliches Protein handelt. Hierbei wird die Fraktion mit den Untereinheiten von 37.000 und 34.000 (MG) als Tropomyosin$_1$ (TM$_1$) und die mit den Untereinheiten von 42.000 und 33.000 (MG) als Tropomyosin$_2$ (TM$_2$) bezeichnet.

Nach der Methode von Cummins & Perry (1973) wurde versucht, die Untereinheiten des Tropomyosin$_1$ durch Ionenaustauscher-Chromatographie in Anwesenheit von Harnstoff zu trennen (Abb. 21). Hierbei stellte sich heraus, daß diese Trennung möglich war, daß jedoch im Vergleich mit dem Tropomyosin des Kaninchen-Skelettmuskels die Elutionsreihenfolge der beiden Komponenten bezogen auf ihre Mobilität im SDS-Gel umgekehrt war. Der erste Peak des auf Abb. 21 dargestellten Elutionsdiagramms enthielt die Komponente mit dem Molekulargewicht von 34.000 (Abb. 19 d) und der zweite Peak bestand aus der Untereinheit mit dem Molekulargewicht von 37.000 (Abb. 19 e).

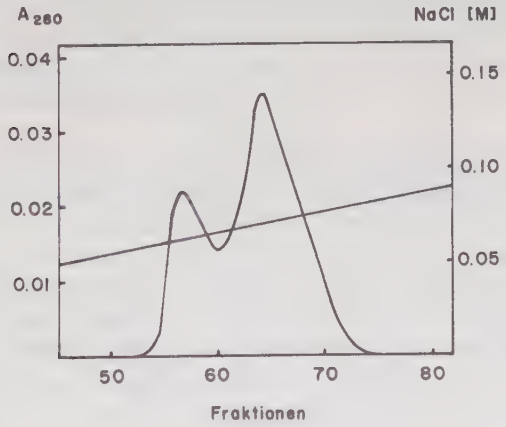


Abb. 21: Elutionsdiagramm einer CM-Cellulose-Chromatographie von Regenwurm-Tropomyosin$_1$. 5 ml Tropomyosin (2 mg/ml) in Equilibrationspuffer (8 M Harnstoff, 50 mM Natriumacetatpuffer, pH 4,0 und 15 mM 2-Mercaptoethanol) wurden auf eine 18 cm x 1,5 cm große Säule von CM-Cellulose 52 aufgetragen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,2 M NaCl in 200 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 6 ml/h in 1 ml-Fraktionen eluiert.

Die Trennung der Untereinheiten des zweiten im Regenwurmmuskel gefundenen Tropomyosin (TM_2) gelang durch DEAE-Chromatographie in Anwensenheit von 7 M Harnstoff mit einem linearen Gradienten an Guanidinhydrochlorid von 0 - 0,33 M (Abb. 22). Bezogen auf die Mobilität der Untereinheiten war die Elutionsreihenfolge die gleiche wie bei den $Tropomyosin_1$-Komponenten, d.h. zuerst wurde die im SDS-Gel schneller wandernde Kette (MG 33.000) und dann die langsamer wandernde (MG 42.000) eluiert (Abb. 19 f und g).

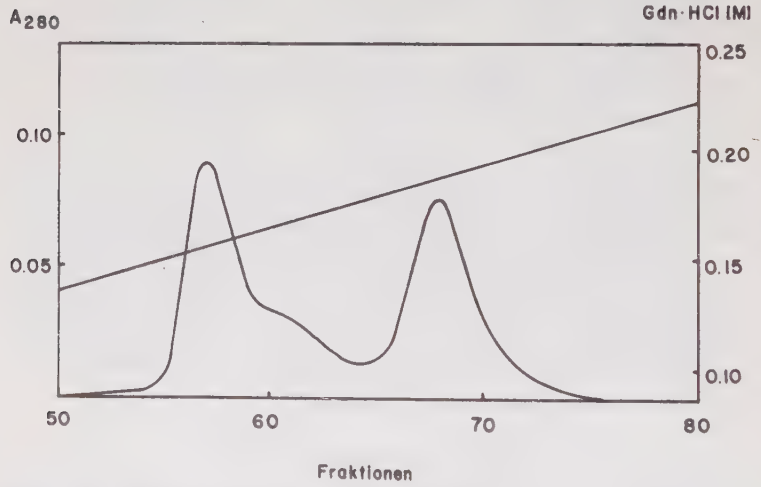


Abb. 22: Elutionsdiagramm einer DEAE-Separose-Chromatographie von Regenwurm-$Tropomyosin_2$. 25 ml Tropomyosin (2,5 mg/ml) wurden gegen Equilibrationspuffer dialysiert (7 M Harnstoff, 5 mM Kaliumphosphatpuffer, pH 6,5, und 5 mM 2-Mercaptoethanol) und auf eine 20 cm x 2,5 cm große Säule von DEAE-Sepharose Cl-6B aufgetragen. Es wurde mit einem linearen Gradienten von 0 - 0,33 M Guanidin-Hydrochlorid in 1200 ml bei einer Durchflußgeschwindigkeit von 35 ml/h in 10 ml-Fraktionen eluiert.

Um Hinweise auf den Cysteingehalt des isolierten Tropomyosins zu erhalten, wurde der Versuch unternommen, die jeweiligen Paare von Untereinheiten durch Disulfidbrücken zu vernetzen. Daher wurden die beiden aus der Regenwurmmuskulatur stammenden Fraktionen Tropomyosin$_1$ und Tropomyosin$_2$ sowie das Tropomyosin der Skelettmuskulatur des Kaninchens parallel nach der Methode von Lehrer (1975) mit 5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat) (DTNB) sowie nach der Methode von Johnson & Smillie (1975) mit Cu als Katalysator zur Dimerbildung behandelt. Die anschießende SDS-PAGE zeigte, daß das Tropomyosin des Skelettmuskels fast ausschließlich in dem für Dimere zu erwartenden Molekulargewichtsbereich von 70.000 im Gel sichtbar war, wohingegen beide Proteine des Regenwurmmuskels entsprechend den unbehandelten Kontrollen im Molekulargewichtsbereich der Monomere um 35.000 auftraten. Es hatte also bei beiden Tropomyosin-Fraktionen des Regenwurms keine Disulfidbrückenbildung stattgefunden.

Dieses Ergebnis läßt unter der Annahme, daß es sich bei beiden Proteinen um Tropomyosin handelt, die Schlußfolgerung zu, daß entweder nur ein oder gar kein Cystein pro Molekül vorliegt, oder daß - falls auf zwei Ketten eines Moleküls jeweils mindestens ein Cystein vorhanden ist - diese an nicht identischen Positionen, d.h. weiter voneinander entfernt liegen. Für das Tropomyosin$_1$ wurde bei einer SH-Gruppenbestimmung[+)] ein Wert von 1,15 SH/mol festgestellt, was nicht im Widerspruch mit dem oben dargestellten Ergebnis der Unfähigkeit zur S-S-Brückenbildung steht.

[+)] Die SH-Gruppenbestimmung wurde nach der Methode von Ellman (1959) von Herrn Dr. Gattner (Wollforschungsinstitut der TH Aachen) freundlicherweise durchgeführt.

3.2 Strukturelle Eigenschaften von Tropomyosin

Unter geeigneten Ionenbedingungen aggregiert Tropomyosin in Form von geordneten parakristallinen Strukturen, welche trotz des unkompliziert erscheinenden filamentösen Aufbaus dieses Moleküls einen ausgeprägten Polymorphismus zeigen können. Nach bisherigen Untersuchungen an Tropomyosinen verschiedener Herkunft hat sich gezeigt, daß diese hochgeordneten parakristallinen Aggregate zum einen als charakteristische Eigenschaft von Tropomyosin anzusehen sind und zum anderen Rückschlüsse auf die Länge der beteiligten Moleküle und ihren Überlappungsgrad bei der Filamentbildung erlauben (Cohen & Longley, 1966;, Millward & Woods, 1970; Huxley, 1963; Fine & Blitz, 1975; Phillips et al., 1980). Besonders im Falle des Regenwurm-Tropomyosins schien der Versuch der Parakristallbildung angebracht, da aus der somatischen Muskulatur dieses Wirbellosen zwei dimere Tropomyosin-Formen isoliert worden waren.

Unter Bedingungen, welche beim Tropomyosin des Skelettmuskels zur Bildung von nadelförmigen Parakristallen führen (0,05 M $CaCl_2$ oder $MgCl_2$, pH 8,0) präzipitierte das rohe unfraktionierte Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur lediglich in Form von amorphen Aggregaten ohne Periodizität. Nur bei pH-Werten nahe dem isoelektrischen Punkt (um pH 4,8) entstanden parakristalline längliche Strukturen mit einem aufgrund der sichtlich lockeren Aggregation leicht verschwommenen, aber regelmäßigen Bandenmuster mit einer Periodizität von ca. 40 nm (Ditgens, 1979).

Erst nachdem durch Ionenaustauscher-Chromatographie eine Reinigung und Trennung der beiden Tropomyosin-Fraktionen voneinander stattgefunden hatte, konnten die Proteine (TM_1 und TM_2) unter den oben aufgeführten leicht basischen Dialysebedingungen zur Bildung von für Tropomyosin charak-

teristischen Parakristallen gebracht werden, welche sowohl licht- als auch elektronenmikroskopisch untersucht wurden.

Die von Tropomyosin$_1$ gebildeten Parakristalle waren meist nadelförmig (Abb. 23 a), doch es wurde auch oft eine bandförmige Aggregationsform festgestellt, welche als bisher noch nicht beschriebene polymorphe Erscheinung von Tropomyosin in Abb. 23 b dargestellt ist. Verdrehungen dieser Parakristallbänder um ihre Längsachse traten in unregelmäßigen Abständen auf. Das Bandenmuster der verschiedenen Parakristalle war deutlich unterschiedlich, die Periodenlänge jedoch war mit ca. 40 nm immer konstant. Es wurden Mischungen von Parakristallen aus Regenwurm-Tropomyosin und Kaninchen-Skelettmuskel-Tropomyosin angefertigt und elektronenmikroskopisch untersucht. Aufnahmen von dicht nebeneinander liegenden Kristalltypen unterschiedlicher Herkunft (Abb. 23 c und f) ermöglichten einen exakten Vergleich der Periodenlängen. Es wurde eine Übereinstimmung in der 40 nm-Periodizität mit weniger als 0,5 % Abweichung gefunden.

Unter denselben Dialysebedingungen bildete Tropomyosin$_1$ auch netzförmige Parakristalle, welche oft gleichzeitig mit den nadelförmigen Strukturen angetroffen werden konnten (Abb. 24). Häufig waren die nadelförmigen Parakristalle an den Enden aufgespreitet und schienen in eine Gitterstruktur überzugehen. Es wurden Netze mit quadratischem und mit hexagonalem Gittermuster gefunden (Abb. 24 b und c). Der Abstand zwischen den Knotenpunkten der Gitter betrug 40 nm und ihre Verbindung erschien meist doppelsträngig.

Unter Bedingungen, welche beim Skelettmuskel-Tropomyosin zur Bildung derartiger netzförmiger Kristalle führen, zeigte das Tropomyosin$_1$ des Regenwurms die schon für das rohe unfraktionierte Regenwurm-Tropomyosin beschriebenen locker aggregierten Parakristalle.

Abb. 23: Parakristalle von Tropomyosin$_1$ aus Regenwurm- bzw. Kaninchen-Skelettmuskulatur. Das Kristallisationsmedium enthielt 50 mM $CaCl_2$, 60 mM KCl und 30 mM Tris-HCl (pH 7,6). (a) Parakristall aus Regenwurm-Tropomyosin, (b) bandförmige Aggregationsform des Regenwurm-Tropomyosins; der Ausschnitt in (e) zeigt vergrößert ein typisches Bandenmuster; (c) Mischungen der Parakristalle von Regenwurm-Tropomyosin (rechts) und Kaninchen-Tropomyosin (links). Die identische Periodenlänge von 40 nm wird in der Ausschnittvergrößerung (f) deutlich. (d) Lichtmikroskopische Übersicht einer Präparation von Parakristallen aus Regenwurm-Tropomyosin. Vergrößerungen: (a und c) x 72.000, (b) x 23.000, (d) x 300, (e und f) x 180.000.

a
b
c
d
e
f

Abb. 24: Elektronenmikroskopische Aufnahmen netzförmiger Kristalle von Tropomyosin$_1$ aus Regenwurmmuskulatur. (a) Tropomyosin-Netz, in einen Parakristall übergehend; (b) rechteckige Netzform; (c) hexagonale Netzform. Das Kristallisationsmedium hatte die gleiche Zusammensetzung, wie in Abb. 23; $CaCl_2$ konnte durch $MgCl_2$ ersetzt werden. Vergrößerungen: (a) x 100.000, (b und c) x 250.000.

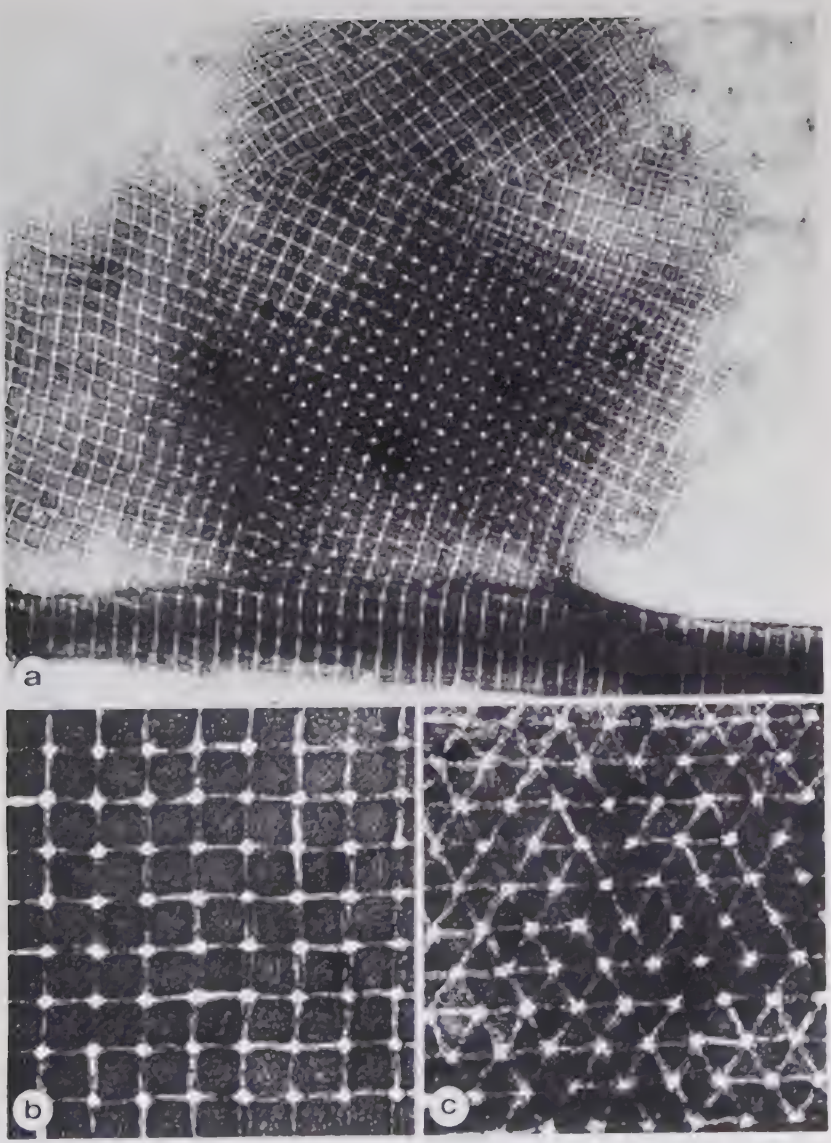
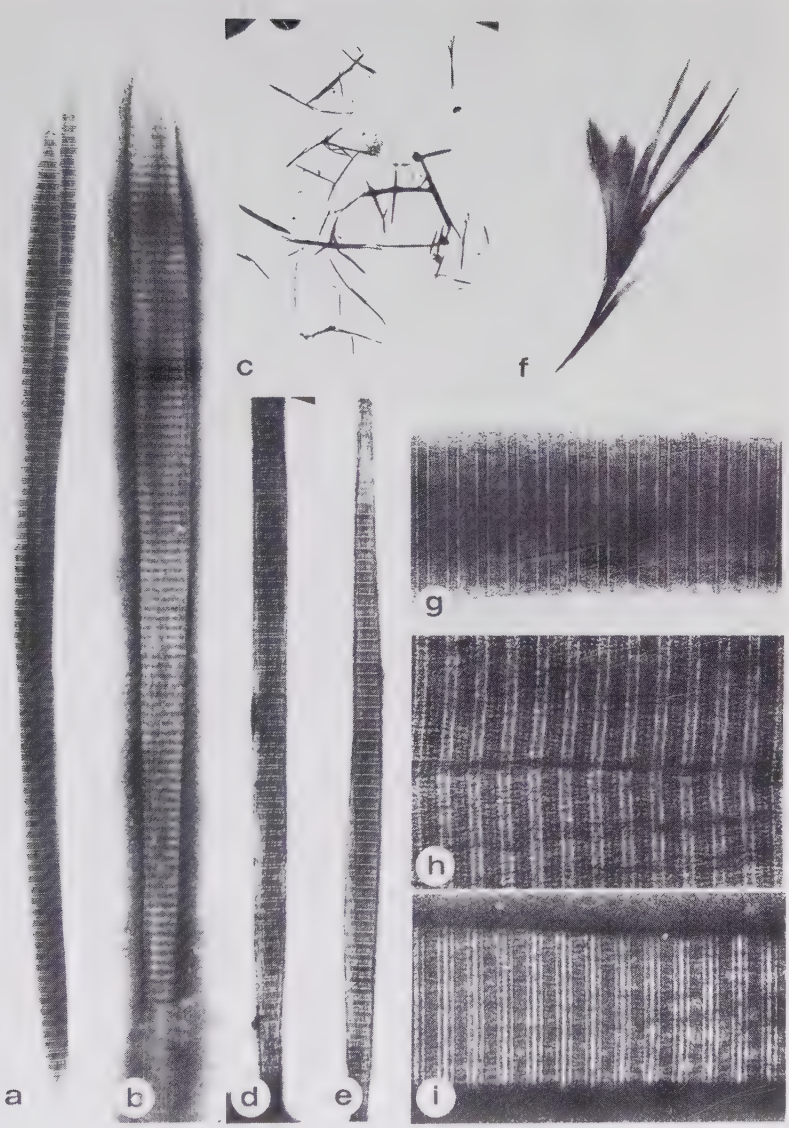

a
b
c

Abb. 25: Vergleich der Parakristalle der beiden Tropomyosin-Isoformen (TM_1 und TM_2) der Regenwurmmuskulatur. Das Kristallisationsmedium hatte die gleiche Zusammensetzung wie in Abb. 23.
(b), (e) und (i) Parakristalle aus Regenwurm-Tropomyosin$_1$; (a), (d), (f) und (h) Parakristalle aus Regenwurm-Tropomyosin$_2$; (c) Übersicht einer Präparation von Parakristallen aus Regenwurm-Tropomyosin$_2$; (g) Parakristall aus Tropomyosin des Kaninchen-Skelettmuskels. Vergrößerungen: (a, b, d und e) x 65.000, (c) x 3.500, (f) x 20.000, (g, h und i) x 180.000.


a
b
c
d
e
f
g
h
i

Die von dem als Tropomyosin$_2$ bezeichneten Protein der Regenwurmmuskulatur gebildeten Parakristalle sind in Abb. 25 dargestellt. Bandförmige Aggregate oder Gitterstrukturen wurden bisher nicht gefunden. Die nadelförmigen Parakristalle schienen des öfteren lateral miteinander verschmolzen, so daß der Eindruck flächiger, gebänderter Strukturen entstand (Abb. 25 f). Das Bandenmuster der untersuchten Tropomyosin$_2$-Parakristalle war einheitlich (Abb. 25 a, d und h) und unterschied sich deutlich von dem der Parakristalle aus Regenwurm-Tropomyosin$_1$ (Abb. 25 b, e und i) und Skelettmuskel-Tropomyosin (Abb. 25 g). Auch das Tropomyosin$_2$ aggregierte immer mit einer Periodizität von ca. 40 nm.

3.3 Funktionelle Eigenschaften von Tropomyosin

Die Existenz von Tropomyosin in Muskeln mit Actin-gekoppelter Ca-Regulation wird durch seine Rolle innerhalb des Regulationsmechanismus plausibel. Die Funktion von Tropomyosin in Muskeln mit allein Myosin-gekoppelter Regulation wird noch diskutiert. Es ist bekannt, daß Tropomyosin in diesen Muskeln, also ohne Anwesenheit von Troponin sowie in vitro ohne Troponin-ähnliche Komponenten und damit unabhängig von der Ca-Konzentration Bewegungen auf dem Actin-Filament vollziehen, bzw. die Actin-Myosin-Interaktion beeinflussen kann (Parry & Squire, 1973; Eaton et al., 1975; Bremel et al., 1972). Daher wurde die funktionelle Charakterisierung des Tropomyosins der Regenwurmmuskulatur sowohl unter dem Aspekt seiner Ca-abhängigen Eigenschaften als auch hinsichtlich seiner Ca-unabhängigen Effekte durchgeführt.

3.3.1 Bindung von Tropomyosin an F-Actin des Skelettmuskels

Die Untersuchung der funktionellen Eigenschaften von Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur, d.h. seiner Wirkung auf die Actomyosin-ATPase-Aktivität erfolgte zumeist innerhalb des Acto-HMM bzw. Acto-SF1-Systems[+)] des Kaninchen-Skelettmuskels. Da naturgemäß jeglicher Einfluß von Tropomyosin auf die Actin-Myosin-Interaktion nur über die Bindung von Tropomyosin an Actin erfolgen kann, wurde zunächst festgestellt, ob beide als Tropomyosin angesprochenen Proteine der Regenwurmmuskulatur unter den bei den ATPase-Aktivitätsmessungen gewählten Grundbedingungen an Actin des Kaninchen-Skelettmuskels binden.

Hierzu wurde Tropomyosin mit F-Actin in Standard-Puffer mit zusätzlich 2 mM $MgCl_2$ gemischt. Aus dieser Mischung läßt sich durch Ultrazentrifugation das Actin nahezu quantitativ sedimentieren, während Tropomyosin nur dann sedimentiert, wenn es an Actin gebunden hat. Abb. 26 zeigt die SDS-PAGE der nach der Inkubation mit $Tropomyosin_1$ erhaltenen Actin-Pellets. Es wird deutlich, daß beide Komponenten dieses Tropomyosin in offensichtlich gleicher Menge an Actin gebunden hatten.

Nach der elektrophoretischen Auftrennung der nach Inkubation mit $Tropomyosin_2$ erhaltenen Pellets war unter der Bande des Actins nur die kleinere Einheit des $Tropomyosin_2$ (33.000) sichtbar. Der nach der Ultrazentrifugation verbleibende Überstand enthielt, wie die Elektrophorese zeigte, ein Protein mit einem Molekulargewicht von 42.000, welches entweder die obere Bande des $Tropomyosin_2$ oder aber nicht sedimentiertes Actin sein konnte. Schließlich konnte durch Auftrennung des Pellets in der zwei-dimensionalen Elektrophorese (Abb. 27) gezeigt werden, daß beide Untereinheiten des $Tropomyosin_2$ entsprechend dem beim $Tropomyosin_1$ erhaltenen Ergebnis an Actin gebunden hatten.

[+)] SF1 = Subfragment-1, Spaltprodukt des Myosins

Abb. 26: Die Bindung von Regenwurm-Tropomyosin$_1$ an F-Actin der Kaninchen-Skelettmuskulatur. Jeweils 1 mg/ml F-Actin wurde mit ansteigenden Mengen von Tropomyosin (0, 0,15, 0,25, 0,5 mg/ml) in Standard-Puffer mit zusätzlich 2 mM $MgCl_2$ gemischt und drei Stunden bei 100.000 x g zentrifugiert. Die Pellets wurden mit Puffer gespült und für die SDS-PAGE inkubiert. Die Elektrophorese erfolgte in 0,6 x 10 cm Rundgelen nach der Methode von Weber & Osborn (1969). A, Actin; TM_1, Tropomyosin$_1$.

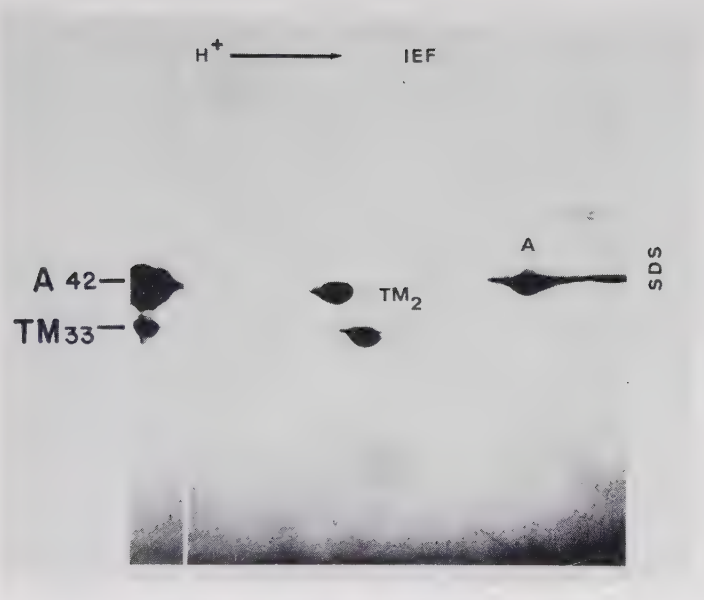


Abb. 27: Die Bindung von Regenwurm-Tropomyosin$_2$ an F-Actin der Kaninchen-Skelettmuskulatur. 1 mg/ml F-Actin wurde mit 0,5 mg/ml Tropomyosin$_2$ in Standard-Puffer mit zusätzlich 2 mM $MgCl_2$ gemischt und drei Stunden bei 100.000 x g zentrifugiert. Das Pellet wurde mit Puffer gespült und durch zwei-dimensionale Elektrophorese aufgetrennt. H^+ markiert den positiven Pol während der ersten Dimension der isoelektrischen Fokussierung (IEF); die zweite Dimension erfolgte im SDS-PAGE-System. Der links neben der Gelplatte abgebildete Gelstreifen stellt die Referenz dar, d.h. die Auftrennung der Probe nur im SDS-PAGE-System. A, Actin; TM, Tropomyosin. Die Zahlen x 10^3 geben die Molekulargewichte an.

3.3.2 Ca-unabhängige Effekte von Tropomyosin auf die Actomyosin-ATPase-Aktivität

Zwei charakteristische Eigenschaften von Tropomyosin der Skelettmuklulatur sind die Hemmung der Acto-HMM-ATPase bei normalen (1 - 2 mM) ATP-Konzentrationen (Eaton et al., 1975) und die Potenzierung der Acto-SF1-ATPase bei niedrigen (5 - 6 µM) ATP-Konzentrationen (Bremel et al., 1972). Diese beiden Effekte von Tropomyosin treten auch ohne die Anwesenheit von Troponin auf und sind somit unabhängig von der Ca-Konzentration.

Aus Abb. 28 wird deutlich, daß auch das Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur einen hemmenden Effekt bei normalen ATP-Konzentrationen und physiologischem Actin-Tropomyosin-Verhältnis auf die Actin-HMM-ATPase-Aktivität ausübt. Ansteigende Mengen von Tropomyosin$_1$ wurden zu Actin-HMM-Mischungen mit variierendem Actin : HMM Gewichtsverhältnis gegeben. Der Grad der durch Tropomyosin verursachten Hemmung nahm mit abnehmender HMM-Menge zu. Im Vergleich mit der von Tropomyosin unbeeinflußten ATPase-Aktivität (Punkt auf der Ordinate) war eine bis zu 80 %ige Hemmung festzustellen. In allen drei Kurven trat der maximale Hemmungseffekt bei einem etwa dem physiologischen entsprechenden Verhältnis von Tropomyosin : Actin auf.

Die hemmende Wirkung des Regenwurm-Tropomyosins ist stärker als die des Skelettmuskel-Tropomyosins. Dies wird besonders deutlich, wenn zu einer mengenmäßig konstanten Mischung von Tropomyosin und HMM Actin in steigender Konzentration zugegeben wurde (Abb. 29). Bei der hier resultierenden relativ geringen HMM-Konzentration war die ATPase-Aktivität durch Regenwurm-Tropomyosin fast vollständig gehemmt. Diese Hemmung trat unabhängig von der Ca-Ionenkonzentration auf. Unter denselben Bedingungen betrug die durch Skelettmuskel-Tropomyosin hervorgerufene maximale Hemmung nur etwa 50 %, was die Ergebnisse von Eaton et al. (1975) bestätigte.

Abb. 28: Die Hemmung der ATPase-Aktivität von Skelettmuskel-Acto-HMM durch Regenwurm-Tropomyosin$_1$. Die Messung der Aktivitäten erfolgte bei verschiedenen Gewichtsverhältnissen von Actin : HMM (1 : 2, ●; 1 : 1, ▲ ; 1 : 0,5, ■). Die Actin-Konzentration war konstant 0,3 mg/ml, die Konzentration von $MgCl_2$ betrug 4 mM. Die ATPase-Aktivität von Actin und HMM betrug 300 nmol P_i x mg HMM^{-1} x min^{-1}, Punkt auf der Ordinate, und wurde als 100 % gesetzt.

Abb. 29: Hemmung der ATPase-Aktivität von Skelettmuskel-Acto-HMM durch Skelettmuskel-Tropomyosin (■) und Regenwurm-Tropomyosin$_1$ (▲, △) im Vergleich zur Actin-Aktivierung ohne Tropomyosin (●). Ansteigende Beträge von entweder Actin allein oder Actin mit Tropomyosin in einem Gewichtsverhältnis von 1 : 0,35 wurden zu HMM (0,34 mg/ml) gegeben. Der hemmende Effekt war unabhängig von der Ca-Konzentration. Die Aktivitäten bei An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole angegeben. Die maximale ATPase-Aktivität von Acto-HMM betrug 1400 nmol P_i x mg HMM^{-1} x min^{-1}, letzter Punkt der oberen Kurve, und wurde als 100 % gesetzt.

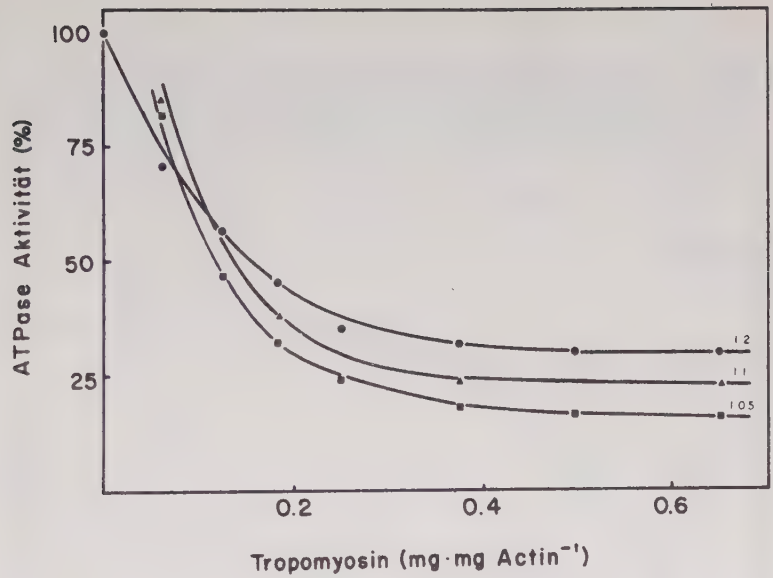

100
75
50
25
ATPase Aktivität (%)
0.2
0.4
0.6
Tropomyosin (mg·mg Actin⁻¹)
1.2
1.1
1.05

Abb. 28

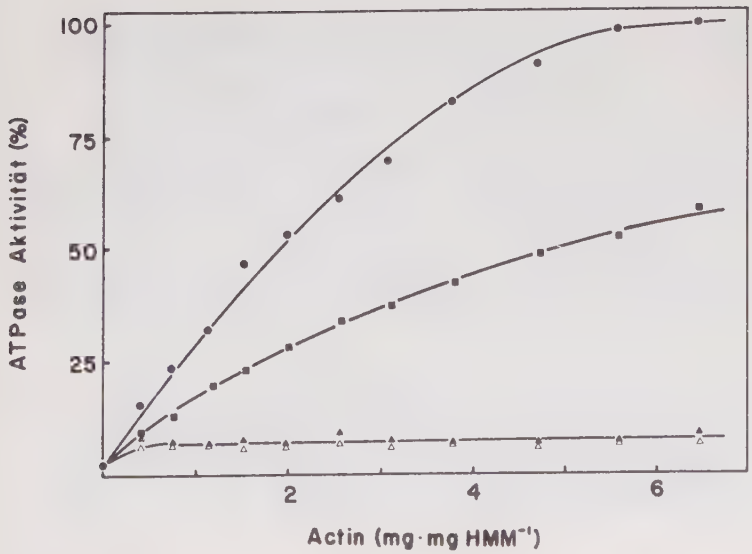

100
75
50
25
ATPase Aktivität (%)
2
4
6
Actin (mg·mg HMM⁻¹)

Abb. 29

Wurde das HMM des Skelettmuskels durch Regenwurm-Myosin ersetzt, so hatte Tropomyosin des Regenwurms unter den gewählten Bedingungen keinen hemmenden Effekt (Abb. 30).

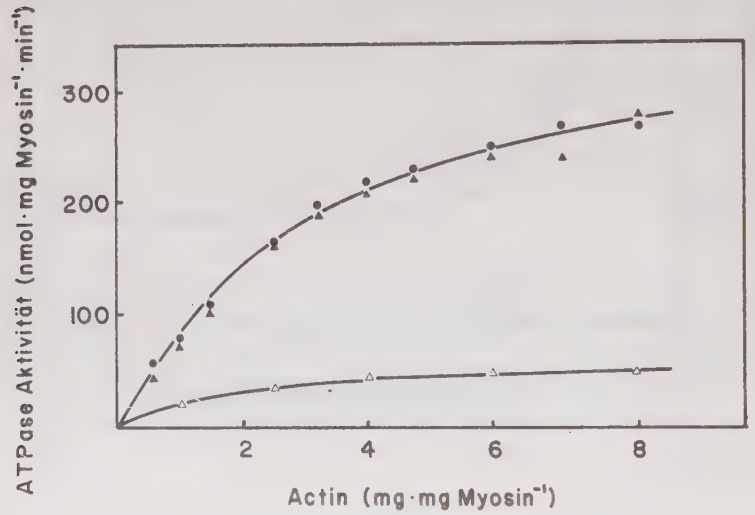


Abb. 30: Aktivierung von Myosin der Regenwurmmuskulatur durch Actin der Kaninchen-Skelettmuskulatur in An- und Abwesenheit von Tropomyosin$_1$ des Regenwurms. Ansteigende Mengen von Actin (●) wurden zu einer konstanten Menge Myosin (0,25 mg/ml) gegeben. Bei zusätzlicher Anwesenheit von Tropomyosin (▲/△) wurde das Gewichtsverhältnis von Tropomyosin : Actin bei 1 : 3 gehalten. Die Aktivitäten in An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole angegeben.

Die Hemmung der Actomyosin-ATPase um 80 % trat nur bei Ca-Abwesenheit auf. Diese Ca-Sensitivität des Systems kann, wie aus Kap. III. 2.2.3 (Abb. 14) hervorgeht, auf die Anwesenheit von regulatorischen Proteinen am Regenwurm-Myosin (D'Haese, 1980) zurückgeführt werden. Für einen direkten Vergleich mit den in Abb. 28 und 29 dargestellten Effekten müßte jedoch anstelle von Myosin das HMM der Regenwurmmuskulatur eingesetzt werden.

Aus Abb. 31 geht hervor, daß nicht nur Tropomyosin$_1$, sondern auch Tropomyosin$_2$ des Regenwurms die Acto-HMM-ATPase-Aktivität in identischem Ausmaß hemmte. Bei dem hier vorliegenden Gewichtsverhältnis von Actin : HMM von 1 : 2 betrug die maximale Hemmung zwischen 60 % und 70 % (vgl. Abb. 28).

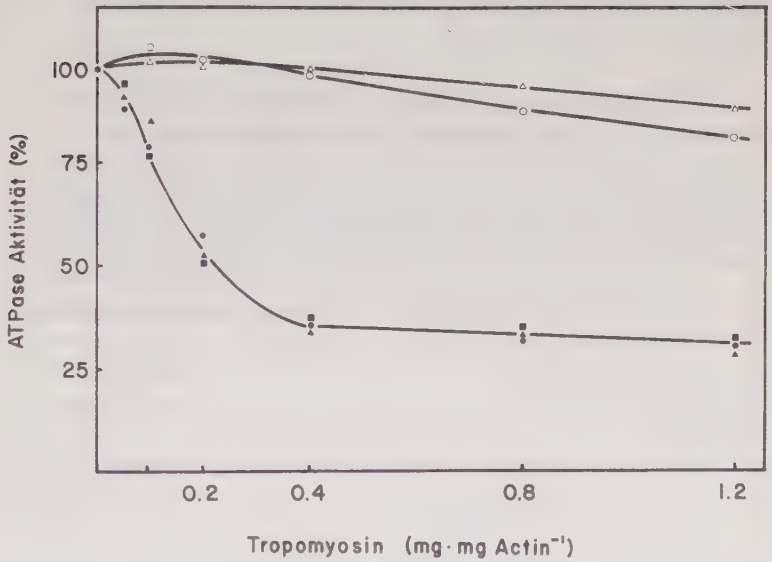


Abb. 31: Der Einfluß von Regenwurm-Tropomyosin auf die ATPase-Aktivität von Acto-HMM der Kaninchen-Skelettmuskulatur. TM_1 (■); TM_2 (▲); $TM_{2(33)}$ (○); $TM_{2(42)}$ (△); rekombinierte Untereinheiten von TM_2, $TM_{2(33)}$: $TM_{2(42)}$ wie 1 : 1 (●). Die ATPase-Aktivität von Acto-HMM betrug 300 nmol P_i x mg HMM^{-1} x min^{-1}, Punkt auf der Ordinate, und wurde als 100 % gesetzt. Die Konzentrationen von Actin und HMM waren 0,25 bzw. 0,5 mg/ml.

Unter den gleichen Bedingungen wurden die durch säulenchromatographische Auftrennung von Tropomyosin$_2$ (vgl. Kap. III. 3.1) erhaltenen Untereinheiten einzeln mit Acto-HMM inkubiert. Sie werden hier entsprechend ihren Mobili-

täten in der SDS-PAGE als $TM_{2(33)}$ und $TM_{2(42)}$ bezeichnet. In Abb. 31 wird deutlich, daß sie isoliert voneinander fast keinen Einfluß auf die ATPase-Aktivität hatten. Wurden sie jedoch als synthetische Mischung in einem Mengenverhältnis von 1 : 1 zu Acto-HMM gegeben, trat eine genauso starke Hemmung auf, wie sie durch das unfraktionierte $Tropomyosin_2$ sowie durch $Tropomyosin_1$ hervorgerufen wurde.

Die Potenzierung der ATPase-Aktivität durch Tropomyosin ist Ausdruck seiner Fähigkeit, einen kooperativen Einfluß auf die einzelnen Monomere des Actin-Filaments auszuüben. Aus Abb. 32 geht hervor, daß der für Skelettmuskel-Tropomyosin typische Potenzierungseffekt auch von $Tropomyosin_1$ der Regenwurmmuskulatur hervorgerufen wurde.

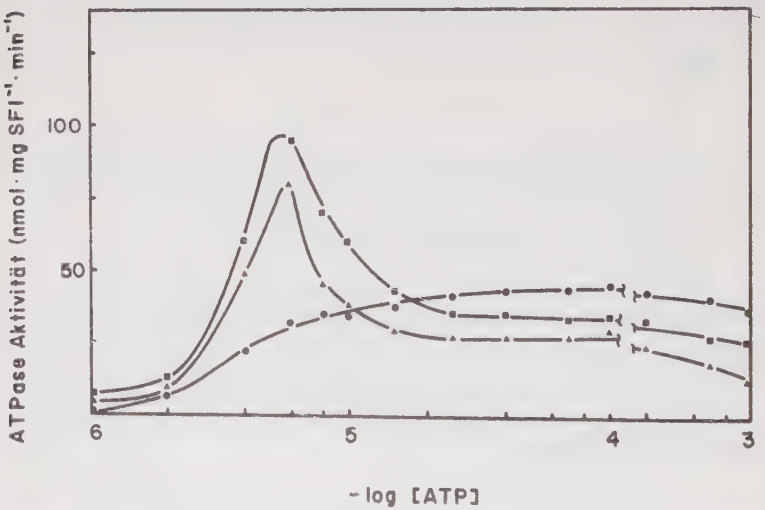


Abb. 32: Der Potenzierungseffekt von Regenwurm- und Skelettmuskel-$Tropomyosin_1$ bei niedriger ATP-Konzentration. Die Konzentrationen von SF1 und Actin waren 8,5 und 0,06 mg/ml. Bei Anwesenheit von Tropomyosin ist das Gewichtsverhältnis Tropomyosin : Actin etwa 1 : 2. Die Potenzierung durch Regenwurm- (▲) und Skelettmuskel-Tropomyosin (■) erfolgt bei 5 - 6 µM ATP und entfällt bei reinem Actin (●).

Der sprunghafte Aktivitätsanstieg erfolgte in demselben ATP-Konzentrationsbereich von 5 - 6 µM. Die unterschiedlichen Aktivitäten bei 1 mM ATP (letzte Punkte der Kurven) verdeutlichten nochmals die stärkere Hemmung der ATPase durch Regenwurm-Tropomyosin.

3.3.3. Die Wirkung von Tropomyosin im Ca-sensitiven Acto-HMM-System des Skelettmuskels

Durch seine potenzierende Wirkung auf die Acto-SF1-ATPase-Aktivität wurde bereits gezeigt, daß das Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur die Fähigkeit besitzt, Gruppen von Actin-Monomeren zu einer kooperativen Einheit zu verbinden. Für eine Wirkung von Tropomyosin innerhalb der Ca-Regulation der Actin-Myosin-Interaktion ist dies eine grundlegende Voraussetzung. Nachdem als sicher angesehen werden kann, daß der Regenwurmmuskel ein Actin-gekoppeltes Ca-Regulationssystem besitzt (Lehman et al., 1972; Lehman & Szent-Györgyi, 1975; s.a. Kap. III. 2. dieser Arbeit), war es notwendig nachzuweisen, daß das Tropomyosin dieses Muskels tatsächlich in der Lage ist, das Signal der Ca-Bindung an ein Troponin-ähnliches Protein auf das gesamte Actin-Filament zu übertragen, bzw. bei Ca-Abwesenheit die Actin-Myosin-Interaktion zu verhindern. In Verbindung mit Troponin eine aktive Rolle im Prozeß der Ca-Regulation zu übernehmen, mag als einer der überzeugensten Nachweise gelten, daß es sich bei den isolierten Proteinen um funktionstüchtiges Tropomyosin handelt.

So wurde der Versuch unternommen, das Tropomyosin der Skelettmuskulatur im Ca-sensitiven Acto-HMM-System des Skelettmuskels durch jeweils eines der beiden Regenwurm-

Tropomyosine zu ersetzen. In Abb. 33 sind die Ergebnisse der ATPase-Aktivitätsmessungen dargestellt. Eine Kontrollreihe, Acto-HMM mit ansteigenden Mengen von Troponin, wurde durchgeführt, da es bekanntermaßen schwierig ist, ein völlig Tropomyosin-freies, funktionstüchtiges Troponin zu präparieren. Aus dem Kurvenverlauf wird auch deutlich, daß das Troponin noch eine geringe regulatorische Aktivität hatte (maximal 20 % Hemmung), welche allerdings bei der Eindeutigkeit des Endergebnisses vernachlässigt werden konnte.

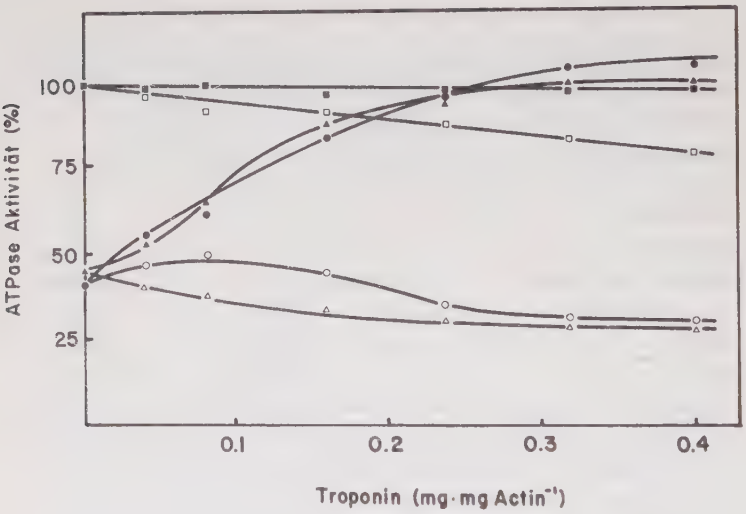


Abb. 33: Hybridisierung von Regenwurm-Tropomyosin und Skelettmuskel-Troponin zu einem funktionstüchtigen TM-TN-Komplex im Acto-HMM-System des Skelettmuskels. Ansteigende Mengen von Troponin wurden in Abwesenheit von Tropomyosin (■ , □) und in der Anwesenheit von entweder $Tropomyosin_1$ (▲ , △) oder $Tropomyosin_2$ (● , ○) zu Skelettmuskel-HMM gegeben. Die Aktivitäten bei An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole angegeben. Die Proteinkonzentrationen waren: HMM, 0,5 mg/ml; Actin, 0,25 mg/ml; Tropomyosin, 0,08 mg/ml. Die maximale ATPase-Aktivität von Acto-HMM betrug 300 nmol P_i x mg HMM^{-1} x min^{-1}, Viereck auf der Ordinate, und wurde als 100 % gesetzt.

Die sowohl von Tropomyosin$_1$ als auch von Tropomyosin$_2$ ausgeübte starke Ca-unabhängige Hemmung der ATPase-Aktivität (Dreieck und Punkt im Vergleich mit Quadrat auf der Ordinate) wurde durch die Anwesenheit von Troponin nur in Gegenwart von Ca gänzlich aufgehoben. Bei Ca-Abwesenheit hatte Troponin so gut wie keinen Einfluß oder eher einen die Hemmung verstärkenden Effekt. Die maximale Neutralisierung der Hemmung durch Ca-besetztes Troponin trat bei einem physiologischen Gewichtsverhältnis von Troponin : Actin auf.

Dieses Hybridisierungsexperiment zeigte deutlich, daß beide im Regenwurmmuskel vorliegende Tropomyosin-Formen in der Lage sind, mit dem Troponin des Kaninchen-Skelettmuskels einen Ca-regulatorisch aktiven Tropomyosin-Troponin-Komplex zu bilden.

4. Der am Actin lokalisierte Komplex regulatorischer Proteine

Die Hybridisierung von Tropomyosin mit dem Troponin der Skelettmuskulatur zu einem Proteinkomplex, welcher in der Lage war, bei Ca-Anwesenheit die Actomyosin-Interaktion zu verhindern, hatte gezeigt, daß die als Tropomyosin charakterisierten Proteine der Regenwurmmuskulatur innerhalb des Ca-sensitiven Actomyosin-Systems des Skelettmuskels wirksam sein können. Es lag die Vermutung nahe, daß diese Proteine auch im nativen Actomyosin des Regenwurms die für das Tropomyosin des Skelettmuskels postulierte Vermittlerfunktion ausüben, nämlich das Signal der Ca-Bindung an ein Troponinähnliches Protein auf das Actin-Filament zu übertragen.

4.1 Die Fixierung der Actin-Filamente

Zwar ist der Wirkungsmechanismus des Tropomyosin-Troponin-Komplexes der Skelettmuskulatur noch nicht völlig verstanden, doch die Vorstellung, daß mit der Änderung der Ca-Konzentration im Sarkoplasma strukturelle Veränderungen der regulierten Actin-Filamente einhergehen, welche mit verschiedenen Funktionszuständen korrellierbar sind (Haselgrove, 1972; Huxley, 1972; Parry & Squire, 1973), ist allgemein anerkannt. Bei Abwesenheit von Ca wird die zyklische Actin-Myosin-Interaktion verhindert, das Actin-Filament befindet sich im inaktiven, "ausgeschalteten" Zustand. Bei Ca-Anwesenheit wird die letztlich in der Kraftentfaltung resultierende ATP-Hydrolyse ermöglicht, das Actin-Filament befindet sich im aktiven, im "angeschalteten" Zustand.

Um Hinweise darauf zu erhalten, ob diese Vorstellung vom "An-" und "Abschalten" der Actin-Filamente auf den Actin-gekoppelten Regulationsmechanismus der Regenwurmmuskulatur übertragbar ist, wurden die nativen dünnen Filamente der Regenwurmmuskulatur nach der Methode von Mikawa (1979) in An- und Abwesenheit von Ca mit Glutaraldehyd vernetzt. (Tab. 2).

Aktivierung der ATPase von HMM aus Kaninchen-Skelettmuskulatur durch Glutaraldehyd-fixierte Thin-filament-Fraktionen aus Regenwurmmuskulatur.

Thin filament-Fraktionen	ATPase-Aktivitäten (nmol $P_i \cdot min^{-1} \cdot mg\ HMM^{-1}$) in Abwesenheit von $CaCl_2$ (2 mM EGTA)	in Anwesenheit von $CaCl_2$ (0,1 mM $CaCl_2$)
Kontrolle	40	233
fixiert in Abwesenheit von $CaCl_2$	56	78
fixiert in Anwesenheit von $CaCl_2$	167	202

Tab. 2

Die Vernetzung von nativen Actin-Filamenten der Regenwurmmuskulatur durch Glutaraldehyd wurde nach der Methode von Mikawa (1979) durchgeführt. Die Inkubationszeit war 4 min. bei einer Temperatur von 4°C. Die Konzentrationen von HMM und nativen Actin-Filamenten im ATPase-Aktivitätstest waren 0,3 bzw. 0,5 mg/ml.

Die unbehandelte Fraktion aktivierte HMM der Skelettmuskulatur in Anwesenheit von Ca, so daß eine ATPase-Aktivität von 233 nmol P_i x mg HMM^{-1} x min^{-1} gemessen wurde. In Abwesenheit von Ca wurde die ATPase-Aktivität um mehr als 80 % gehemmt. Diese Ca-sensitive Thin-filament-Fraktion wurde

sowohl in An- als auch in Abwesenheit von Ca mit Glutaraldehyd inkubiert. Beide Proben wurden anschließend mit HMM zusammen im ATPase-Aktivitätstest untersucht. Es stellte sich heraus, daß sie nach ihrer Fixierung nicht mehr auf die Ca-Konzentration reagierten. Die in Abwesenheit von Ca fixierte Fraktion aktivierte HMM nur noch in geringem Maße und zwar sowohl bei Ab- als auch bei Anwesenheit von Ca (56 und 78 nmol P_i x mg HMM^{-1} x min^{-1}). Dagegen war die in Anwesenheit von Ca fixierte Fraktion, auch ohne daß Ca in der Testlösung vorlag, fähig, das HMM zu aktivieren (167 nmol P_i^{-1} x mg HMM^{-1} x min). Dies zeigte, daß es gelungen war, die Actin-Filamente in zwei funktionellen Zuständen, "an"- und "ausgeschaltet" zu fixieren, so daß spätere Änderungen der Ca-Konzentration keinen Einfluß mehr hatten.

4.2 Isolierung der regulatorischen Proteine

Methoden, welche sich bei der Präparation von Tropomyosin-Troponin der Skelettmuskulatur bewährt hatten, waren zur Isolierung des entsprechenden Proteinkomplexes der Regenwurmmuskulatur nicht geeignet. Erfolgreich war das in Kap. II. 2.1 dargestellte Verfahren, bei welchem das Actin des Rohextraktes der Thin-filament-Fraktion durch Ansäuerung denaturiert und ausgefällt wurde, wohingegen die regulatorischen Proteine durch den niedrigen pH nicht geschädigt wurden (Ditgens, 1979). In Anlehnung an die Actin-gekoppelten regulatorischen Proteine der Skelettmuskulatur wurde die so erhaltene Fraktion als Tropomyosin-Troponin (TM-TN) bezeichnet. Die SDS-PAGE dieser Fraktion (Abb. 34 b) zeigt, daß ihr größter Proteinanteil aus Tropomyosin bestand. Zur besseren Deutung ihres Bandenmusters ist in Abb. 34 a eine Thin-filament-Fraktion dargestellt.

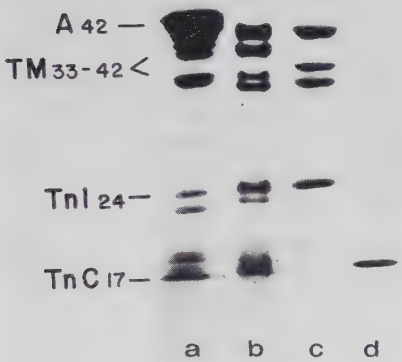


Abb. 34: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese von Protein-Fraktionen aus Regenwurmmuskulatur. (a) Thin-filament-Fraktion, (b) Tropomyosin-Troponin, (c) Fraktion eines Troponin-I-ähnlichen Proteins, (d) Fraktion eines Troponin-C-ähnlichen Proteins. A, Actin; TM, Tropomyosin; TnC, Troponin-C; TnI, Troponin-I; die Zahlen x 10^3 geben die Molekulargewichte an.

Diese enthält zusätzlich zu Actin und Tropomyosin weitere Banden mit niedrigeren Molekulargewichten, wovon zwei als Troponin-I (TnI) bzw. Troponin-C (TnC) bezeichnet sind. Diese Benennung ergab sich aus funktionellen Tests, auf die später eingegangen wird.

4.3 Wirkung von Regenwurm-Tropomyosin-Troponin im Acto-HMM-System des Skelettmuskels

Die Präparation der Actin-gekoppelten regulatorischen Proteine erfolge unter der Zielsetzung, einen funktionstüchtigen, dem TM-TN des Skelettmuskels entsprechenden Proteinkomplex zu erhalten. Als Testsystem wurde das Ca-insensitive Acto-HMM-System des Kaninchen-Skelettmuskels gewählt. Abb. 35 zeigt, daß ansteigende Mengen der TM-TN-Fraktion aus Regenwurmmuskulatur bei Ca-Anwesenheit einen leicht aktivierenden Effekt auf die Acto-HMM-ATPase hatten, wohingegen bei Ca-Abwesenheit eine zunehmende Hemmung festgestellt werden konnte. Die maximale Hemmung der Acto-HMM-ATPase betrug 80 %. Orientiert am physiologischen Gewichtsverhältnis von TM-TN : Actin im Skelettmuskel (0,5 : 1) wurde dieser Maximalwert hier bei einem Verhältnis von 1,5 : 1 (TM-TN : Actin) relativ spät erreicht.

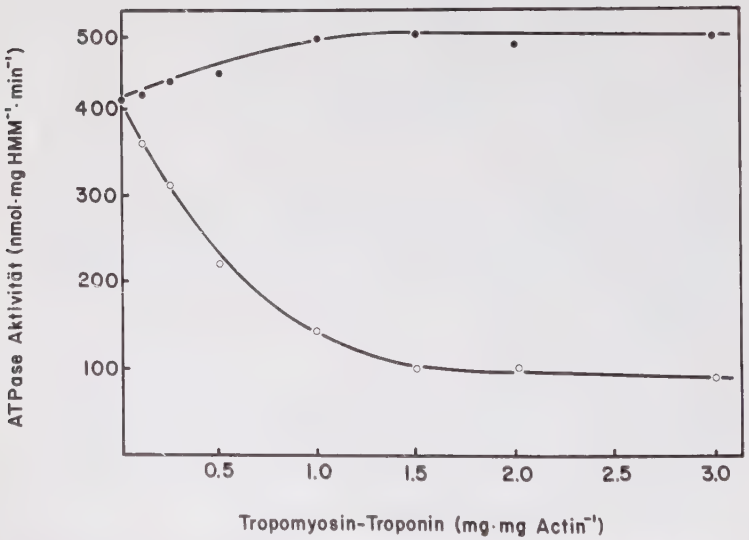


Abb. 35: Der Effekt von Regenwurm-Tropomyosin auf die ATPase-Aktivität und Ca-Sensitivität von unreguliertem Acto-HMM der Kaninchen-Skelettmuskulatur. Die Konzentrationen von Actin und HMM waren jeweils 0,2 mg/ml. Die Aktivitäten in An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole angegeben.

Das Testergebnis zeigte deutlich, daß die als TM-TN bezeichnete Fraktion regulatorischer Proteine der Regenwurmmuskulatur in der Lage war, desensibilisiertem Acto-HMM Ca-Sensitivität zu verleihen, daß sie also als funktionstüchtiger Komplex isoliert wurde.

4.4 Bindungseigenschaften der regulatorischen Proteine und ihre Wirkung im desensibilisierten Actomyosin des Regenwurms

Bei Orientierung an dem, was über den Regulationsmechanismus des Skelettmuskels bekannt ist, und nach den Darstellungen in Kap. III. 3.3.1 (Bindung von Tropomyosin an F-Actin) dürfte die Bindung des Tropomyosin-Troponin-Komplexes des Regenwurms über Tropomyosin an Actin als Voraussetzung für die oben dargestellte erfolgreiche Hybridisierung, den Ersatz von Tropomyosin-Troponin des Skelettmuskels durch den entsprechenden Proteinkomplex der Regenwurmmuskulatur, anzusehen sein. Es kann angenommen werden, daß unter nicht dissoziierenden Bedingungen der gesamte Komplex regulatorischer Proteine an Actin bindet.

Da die TM-TN-Fraktion sämtliche Proteine des Thin-filament-Rohextraktes enthält, welche nach Erniedrigung des pH auf 2,0 noch löslich sind, kann davon ausgegangen werden, daß diese nicht alle zum Komplex der regulatorischen Komponenten gehören. Durch einen Versuch, welcher von der praktischen Durchführung her dem der Bindung von Tropomyosin an Actin (vgl. Kap. III. 3.3.1) entspricht, wurde beabsichtigt, die Actin-bindenen Proteine und Protein-Fragmente aus der rohen TM-TN-Fraktion zu selektieren. Abb. 36 dokumentiert das Versuchsergebnis. Die Zentrifugation der Mischung einer rohen TM-TN-Fraktion (Abb. 36 c) und Actin

(Abb. 36 b) ergab ein Pellet, welches in Abb. 36 d dargestellt ist. Neben dem Tropomyosin sind mehrere Proteinkomponenten mit dem Actin sedimentiert.

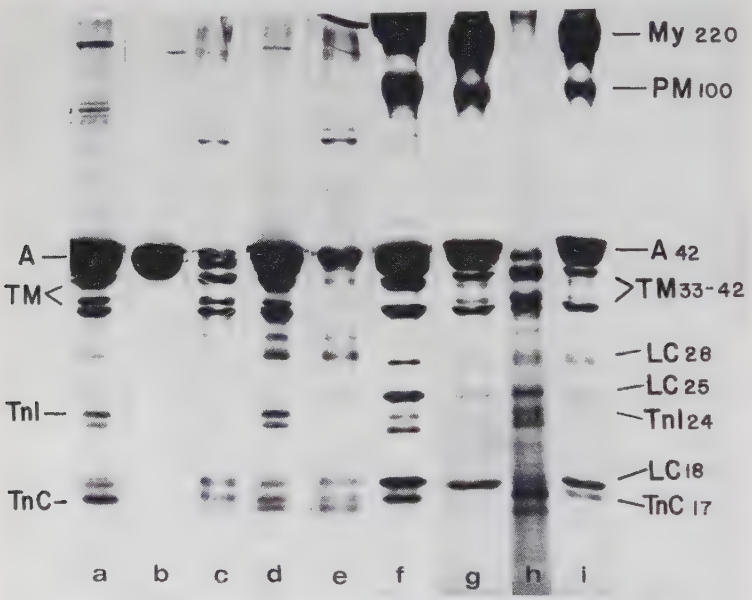


Abb. 36: SDS-Polyacrylamid-Gelelektrophorese zur Demonstration der Bindungseigenschaften von Regenwurm-Tropomyosin-Troponin an F-Actin des Kaninchen-Skelettmuskels (a - e) und an desensibilisiertes Regenwurm-Actomyosin (f - i). Außer (b) und (c) bestehen alle Fraktionen aus Regenwurm-Proteinen. (a) Thin-filament-Fraktion, (b) F-Actin der Skelettmuskulatur, (c) Tropomyosin-Troponin (TM-TN), (d) sedimentierte Actin-Filamente der Skelettmuskulatur (b) nach Inkubation mit Regenwurm-TM-TN (c), (e) nicht sedimentierte Anteile im Überstand; (f) Actomyosin, (g) desensibilisiertes Actomyosin, (h) TM-TN, (i) durch TM-TN resensibilisiertes Actomyosin. A, Actin; LC, leichte Ketten des Myosins; PM, Paramyosin; TM, Tropomyosin, TnC, Troponin-C; TnI, Troponin-I. Die Zahlen x 10^3 geben die Molekulargewichte an.

Auffällig sind Banden mit Molekulargewichten von 30.000, 24.000 (TnI) und 23.000. Der Vergleich der Gele Abb. 36 c - e zeigt, daß die als TnI bezeichnete Bande und die direkt darunter liegende offensichtlich quantitativ im Pellet vorlagen, denn im Überstand waren sie nicht mehr anzutreffen. Die Bande von 30.000 wird als Fragment eines direkt oder indirekt an Actin bindenden Proteins angesehen, denn in der TM-TN-Fraktion ist sie nicht in der Intensität wie in Pellet oder Überstand sichtbar. Im Molekulargewichtsbereich um 17.000 sind im Pellet drei Banden vertreten, die allerdings nicht als Anreicherungen bezeichnet werden können, da sie auch in den Gelen Abb. 36 c und e in ähnlichem Ausmaß zu finden sind. Die leichte Kette des Myosins (LC_{25}), welche als Verunreinigung in der TM-TN-Fraktion vorlag, befand sich nach dem Experiment fast ausschließlich im Überstand.

Nach seiner Hybridisierung mit dem Actin der Skelettmuskulatur wurde TM-TN in seinem Ursprungssystem, dem Actomyosin der Regenwurmmuskulatur, eingesetzt. Nach einem Verfahren von D'Haese (unveröff.) ist es möglich, das dual regulierte Regenwurm-Actomyosin zu desensibilisieren. Hierbei werden Komponenten sowohl des Actin- als auch des Myosin-gekoppelten Regulationssystems eliminiert, wodurch beide Systeme funktionsuntüchtig werden, d. h. das resultierende Actomyosin ist nicht mehr Ca-sensitiv. Es bestand nun die Frage, ob es möglich war, mit der TM-TN-Fraktion die Ca-Sensitivität des desensibilisierten Actomyosins zu restaurieren. Es wurde zunächst versucht, festzustellen, welche Komponenten der TM-TN-Fraktion an das Actomyosin binden können.

Abb. 36 g zeigt, daß beim desensibilisierten Actomyosin im Vergleich mit dem nicht behandelten (Abb. 36 f) die Banden mit den Molekulargewichten von 25.000 (LC), 24.000 (TnI), 23.000 und 17.000 (TnC) nur noch schwach oder gar nicht mehr sichtbar waren. Dieses desensibilisierte Actomyosin wurde mit einer TM-TN-Fraktion (Abb. 36 h) in Standard-Puffer gemischt und durch Zentrifugation

in einer Eppendorfzentrifuge wurde ein Pellet erhalten, welches nach Waschen mit Standard-Puffer elektrophoretisch aufgetrennt wurde (Abb. 36 i). Daraus ist ersichtlich daß die Proteine mit den Molekulargewichten von 24.000 und 17.000, welche als TnI bzw. TnC angesprochen werden, in diesem Pellet angereichert waren, d. h., daß sie an das desensibilisierte Actomyosin gebunden hatten.

Durch die Zugabe der TM-TN-Fraktion wurde das desensibilisierte Actomyosin wieder Ca-sensitiv. Dies geht aus Tabelle 3 hervor.

Der Effekt von Tropomyosin-Troponin (TM-TN) der Regenwurmmuskulatur auf die ATPase-Aktivität und Ca-Sensitivität von desensibilisiertem Actomyosin (AM des) der Regenwurmmuskulatur

	ATPase-Aktivität (nmol · mg AM^{-1} · min^{-1})		Ca-Sensitivität %
	Ca	EGTA	
AM des	244	23o	6
AM des + TM-TN	276	114	59
+ HMM	332	33o	1
+ HMM + TM-TN	375	235	37
+ Actin	255	231	9
+ Actin + TM-TN	291	16o	45

Tab. 3

HMM und Actin stammten aus der Skelettmuskulatur des Kaninchens. Die Proteine waren in folgenden Konzentrationen vorhanden: desensibilisiertes Actomyosin (AM des) 0,5 mg/ml; Tropomyosin-Troponin (TM-TN), 0,35 ml/ml); HMM, 0,5 mg/ml; Actin 0,5 mg/ml.

Die restliche Ca-Sensitivität von 6 % erhöhte sich auf 59 %. Bei einem Actomyosin, welches ohne vorherige Behandlung dual reguliert ist, läßt dieses Ergebnis keine ein-

deutigen Schlüsse zu, auf welcher Grundlage diese teilweise Restaurierung der Ca-Sensitivität erfolgt ist. Da es sich beim Tropomyosin-Troponin-Komplex um aus der Thin-filament-Fraktion isolierte Proteine handelt, lag die Vermutung nahe, daß die Hemmung der ATPase-Aktivität bei Abwesenheit von Ca- auf einer Wiederherstellung der Actin-gekoppelten Regulation beruhte.

Mit der Resensibilisierung des Regenwurm-Actomyosins bot sich ein weiterer Angriffspunkt für die Fragestellung, ob funktionelle Zusammenhänge zwischen den beiden Regulationssystemen des dual regulierten Actomyosins bestehen. Hier sei an den Versuch in Kap. III. 3.3.2 (Abb. 30) erinnert, welcher bezüglich des isolierten Tropomyosins ein negatives Ergebnis gezeigt hatte, daß dieses nämlich keinen Einfluß auf die Actin-aktivierte ATPase des Regenwurm-Myosins ausübte.

Um einen Hinweis zu erhalten, in welchem Maße die festgestellte Ca-Sensitivität von annähernd 60 % auf einer Restaurierung der Myosin- oder der Actin-Regulation beruhte, wurde mit dem schon aus Kap. III. 2.2.2 bekannten Actin- bzw. Myosin-Bindungstest gearbeitet.
Die erhaltenen ATPase-Aktivitäten sind in Tabelle 3 aufgeführt. Hieraus geht hervor, daß beide Regulationssysteme teilweise rekonstituiert worden waren, wobei der Wert für die Myosin-gekoppelte Regulation mit 45 % Ca-Sensitivität noch höher lag als der für die Actin-gekoppelte von 37 %.

Eine teilweise Restaurierung der Actin-gekoppelten Regulation ist auf dem Hintergrund der oben dargestellten Bindung von als TnI und TnC angesehenen Proteinen nicht so erstaunlich wie die partielle Wiedererlangung an Ca-Sensitivität des Myosin-gekoppelten Regulationssystems, denn aus Abb. 36 g - i geht hervor, daß offensichtlich

keine Anreicherung der LC_{25} im resensibilisierten Actomyosin stattgefunden hatte.

4.5 Isolierung einer Troponin-ähnlichen Fraktion

Zur Präparation von Troponin lag es nahe, den schon vorliegenden Tropomyosin-Troponin-Komplex nach der Methode von Ebashi et al. (1968) durch isoelektrische Präzipitation des Tropomyosins in Anwesenheit von 0,4 M LiCl aufzutrennen. Dies gelang jedoch nur unvollständig. Auch Adsorptionschromatographie der Tropomyosin-Troponin-Fraktion auf Hydroxylapatit nach der Methode von Eisenberg & Kielley (1974) erbrachte nicht den gewünschten Erfolg. D.h. die nach elektrophoretischer Auftrennung recht vielversprechend aussehende Fraktion - es fanden sich Proteinanreicherungen in den Bereichen der entsprechenden Skelettmuskel-Troponin-Komponenten - hatte keine biologische Aktivität mehr, was anschließende Funktionstests (s. u.) zeigten. Daher wurde eine andere Präparationsmethode, ausgehend vom Actomyosin, angewandt. Nach der im Schema auf S. 58 dargestellten isoelektrischen Präzipitation von Tropomyosin, bei welcher auch Actin, Myosin und Paramyosin ausgefällt wurden, konnte eine rohe Troponin-Fraktion aus dem Überstand durch 65 %ige Ammoniumsulfat-Sättigung gewonnen werden. Die SDS-PAGE dieser Fraktion zeigte, daß sie stark verunreinigt war. Teilweise wurden die unbekannten Proteinkomponenten als proteolytische Spaltprodukte angesehen, da sie nach Auftrennung von rohem Actomyosin nicht anzutreffen waren.

4.6 Rekonstitution eines Tropomyosin-Troponin-Komplexes

Eine für Troponin typische Eigenschaft ist es, mit Tropomyosin einen Komplex zu bilden, welcher in der Lage ist, synthetischem Actomyosin Ca-Sensitivität zu verleihen. Unter diesem Aspekt wurden die auf oben dargestelltem Wege erhaltenen Troponin-Fraktionen funktionell getestet. Trotz ihrer Verunreinigungen zeigten einige dieser Fraktionen ein für Troponin zu forderndes Verhalten. In Abb. 37 ist eines der Testergebnisse dargestellt, welches in dieser eindeutigen Weise jedoch nur schwer reproduzierbar war.

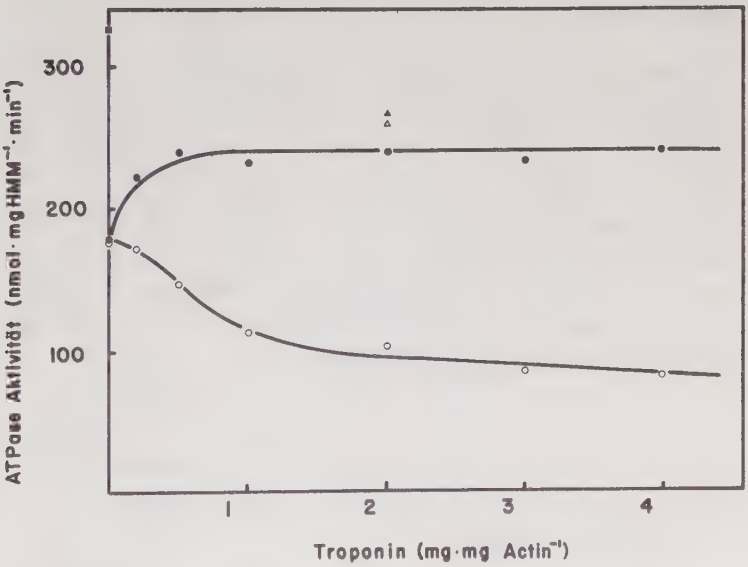


Abb. 37: Rekombination von Regenwurm-Troponin und Regenwurm-Tropomyosin zu einem funktionstüchtigen TM-TN-Komplex im Acto-HMM-System der Kaninchen-Skelettmuskulatur. Steigende Mengen einer rohen Troponin-Fraktion wurden zu Acto-HMM in Anwesenheit (Kreise) und Abwesenheit (Dreiecke) von Tropomyosin gegeben. Die ATPase-Aktivität von Acto-HMM ist durch ein Viereck auf der Ordinate angegeben. Die Aktivitäten in An- und Abwesenheit von Ca sind durch gefüllte bzw. offene Symbole gekennzeichnet. Die Konzentrationen von Actin und HMM waren 0,25 bzw. 0,5 mg/ml.

Häufig ergaben sich niedrigere Werte für die erreichte Ca-Sensitivität des Systems. Die als Troponin bezeichnete Fraktion hemmte die Acto-HMM-ATPase leicht. Dieser Einfluß war unabhängig von der Ca-Konzentration (Dreiecke in Abb. 37). Daraus konnte auf dem Hintergrund des Gesamtergebnisses gefolgert werden, daß kein Tropomyosin mehr in der Fraktion enthalten war, denn erst die Zugabe von Regenwurm-Tropomyosin führte zu einer Ca-abhängigen Reaktion des Systems. Die durch Tropomyosin des Regenwurms hervorgerufene Hemmung der ATPase (Punkte auf der Ordinate) wurde durch Troponin bei Ca-Anwesenheit zum Teil aufgehoben, wohingegen sie bei Ca-Abwesenheit noch verstärkt wurde.

Der rekonstituierte Tropomyosin-Troponin-Komplex war also in der Lage, desensibilisiertem Acto-HMM Ca-Sensibilität zu verleihen. Aus den Aktivitäten bei An- und Abwesenheit von Ca errechnete sich ein Wert für die Ca-Sensitivität von ca. 70 %. Diese Ca-Sensitivität wurde erst bei einem erheblichen Überschuß der Fraktion, bezogen auf die vorhandenen Mengen an Actin und Tropomyosin, erreicht, was durch die starken Verunreinigungen der Fraktion oder durch teilweise proteolytische Zersetzung der zur Regulation benötigten Komponenten zu erklären wäre.

4.7 Versuch der Auftrennung des Troponins in seine Untereinheiten

In Anlehnung an die Methode von Greaser & Gergely (1971, 1973; zus. Darst. Potter, 1982), wurde versucht, das rohe Troponin der Regenwurmmuskulatur durch Ionenaustauscher-Chromatographie in Anwesenheit von Harnstoff zu fraktionieren. Hierbei wurden verschiedene Variationen erprobt.

Diese bezogen sich auf das Volumen der Säule selbst sowie das des zur Elution verwendeten Gradienten und auf die Zusammensetzung des Säulenpuffers, seines Gehalts an EDTA bzw. EGTA und seines pH-Wertes. Auch bei der Herstellung der Ausgangsfraktion, des Troponin selbst, wurden verschiedene Methoden angewandt. Es wurde sowohl aus nativem Actomyosin - wie aus dem Schema S. 58 hervorgeht - als auch aus Ethanol-Ether-getrocknetem Actomyosin hergestellt. Zusätzlich wurde versucht, durch Erhöhung des pH-Wertes bei der isoelektrischen Präzipitation des Tropomyosins einen Teil von Tropomyosin zur Stabilisierung des Troponins in der Fraktion zu belassen. Trotz dieser Bemühungen hatte sich gezeigt, daß die durch die Säulenchromatographie erhaltenen Fraktionen nach Entfernung des Harnstoffes keine funktionelle Aktivität (s.u.) mehr hatten. Daraus wurde geschlossen, daß u.U. eine Renaturierung der Proteine nach der Harnstoffbehandlung nicht mehr möglich war. Da außer der Chromatographie in Anwesenheit von Harnstoff keine andere Methode zur Fraktionierung von Troponin in seine drei Untereinheiten bekannt ist, mußte nach anderen Möglichkeiten gesucht werden, eine Dissoziation der Komponenten zu erreichen.

Da die Interaktion der Troponin-Untereinheiten größtenteils Ca-abhängig ist (Potter & Johnson, 1982), wurde versucht, durch Ca-Entzug in Gegenwart von 10 mM EDTA eine Trennung zu erreichen. Es wurden daher die gleichen Bedingungen zur Chromatographie gewählt, wie sie bei der Fraktionierung des rohen Tropomyosins (Abb. 20) angewandt worden waren. Hierbei wurden eine TnI-ähnliche und eine TnC-ähnliche Fraktion gewonnen (s.u.). Die als TnI angesprochene Fraktion wurde im Bereich von 150 mM KCl eluiert und war noch stark durch Proteine im Molekulargewichtsbereich um 40.000 verunreinigt (Abb. 34 c). Die das TnI repräsentierende Bande ließ auf ein Molekulargewicht von 24.000 schließen. Bei etwa 250 mM KCl wurde

die als TnC angesehene Komponente eluiert (Abb. 34 d). Das Molekulargewicht dieses Proteins betrug ca. 17.000. Wie schon angedeutet, erfolgte die Zuordnung dieser Bezeichnungen, welche für die entsprechenden Troponin-Untereinheiten des Skelettmuskels üblich sind, nach der funktionellen Untersuchung dieser Proteine, wie sie nachfolgend dargestellt wird.

4.8 Identifizierung der isolierten Troponin-Untereinheiten

Eine Eigenschaft des TnI der Skelettmuskulatur, welche zu seiner Entdeckung und seiner Namensgebung führte, ist seine Fähigkeit, spezifisch die Mg-aktivierte ATPase von Actomyosin zu hemmen (Perry et al., 1966; Hartshorne et al., 1966). Der maximale Grad an Hemmung wird erreicht, wenn ein TnI-Molekül pro Actin-Monomer vorhanden ist. Durch Anwesenheit von Tropomyosin wird der hemmende Effekt insofern verstärkt, als daß ein TnI-Molekül pro 3 - 4 Actin-Monomere ausreichend ist, um die gleiche Wirkung zu erzielen (Perry et al., 1972). Dies impliziert eine Kooperativität zwischen einzelnen Actin-Monomeren, und der Hemmungseffekt wird auf eine Interaktion von TnI, Actin, Tropomyosin und eventuell Myosin selbst zurückgeführt (zusf. Darst. Perry, 1979). Eine Eigenschaft von TnC ist es, den inhibitorischen Effekt des TnI auf die Actomyosin-ATPase unabhängig von der Ca-Konzentration zu neutralisieren (Schaub et al., 1972; Perry, 1972).

Tabelle 4 zeigt , daß die aus der rohen Fraktion an Regenwurm-Troponin isolierten Komponenten die oben für die entsprechenden Proteine der Skelettmuskulatur aufgeführten Eigenschaften aufwiesen.

Der Effekt von TnI- und TnC-ähnlichen Proteinen aus Regenwurmmuskulatur auf die Acto-HMM-ATPase-Aktivität.

a) Verstärkung der TnI-Hemmung durch Tropomyosin

b) Aufhebung der TnI-Hemmung durch TnC

		ATPase-Aktivität ($nmol \cdot mg\ HMM^{-1} \cdot min^{-1}$)	Hemmung %
	HMM + Actin	353	
	HMM + Actin + TM	262	25
a)	HMM + Actin + TnI	331	6
	HMM + Actin + TM + TnI	176	50
b)	HMM + Actin + TnI	67	75
	HMM + Actin + TnI + TnC	289	18

Tab. 4

Die Proteine waren in folgenden Konzentrationen vorhanden: HMM der Kaninchen-Skelettmuskulatur, 0,5 mg/ml; Actin der Kaninchen-Skelettmuskulatur, 0,25 mg/ml; Tropomyosin der Kaninchen-Skelettmuskulatur (TM), 0,1 mg/ml; Troponin-I der Regenwurmmuskulatur (TnI), 0,07 mg/ml (a); 0,5 mg/ml (b); Troponin-C der Regenwurmmuskulatur (TnC) 0,25 mg/ml).

TnI wurde in ansteigenden Mengen zu einer Mischung von Actin und HMM der Skelettmuskulatur gegeben. Hierbei stellte sich eine deutliche Hemmung der ATPase-Aktivität ein. Diese wurde durch die Anwesenheit von Tropomyosin verstärkt. In Tab. 4 sind ausgewählte Werte der resultierenden Kurven dargestellt.

In relativ geringer Menge (Tab. 4 a) hatte TnI nur mäßigen Einfluß auf die Acto-HMM-ATPase. Durch die Anwesenheit von Tropomyosin wurde die Hemmungswirkung des TnI verstärkt. Die von Tropomyosin allein bewirkte Hemmung der Acto-HMM-ATPase betrug unter den herrschenden Bedingungen 25 %. Zusammen mit der Menge an TnI, die nur zu einer 6 %igen Verringerung der ATPase-Aktivität geführt hatte, hatte Tropomyosin einen derart die TnI-Wirkung verstärkenden Effekt, daß nur noch 50 % der Ausgangs-ATPase-Aktivität gemessen wurde.

Wurde TnI in der etwa sieben-fachen Menge zu Acto-HMM gegeben, so trat eine 75 %ige Hemmung der ATPase-Aktivität ein. Durch Zugabe des TnC-ähnlichen Proteins bei einem Gewichtsverhältnis der Fraktionen von TnI : TnC wie 0,5 : 1 wurde diese Hemmung größtenteils aufgehoben. Sie betrug nur noch 18 %.

Diese Egebnisse deuten darauf hin, daß trotz ihrer unterschiedlichen Reinigungseigenschaften funktionelle Ähnlichkeiten zwischen dem Troponin der Skelettmuskulatur von Wirbeltieren und dem entsprechenden Proteinkomplex der Regenwurmmuskulatur bestehen.

IV. Diskussion

Im Rahmen dieser Arbeit wurden erstmalig Untersuchungen der schräggestreiften Muskulatur gezielt an Einzelzellen vorgenommen. So war es möglich, das Kontraktionsverhalten isolierter Zellen und nach Glycerinierung zusätzlich das ihrer kontraktilen Einheiten zu betrachten.

Durch schonende Collagenasebehandlung gelang es, die Zellen in kontraktionsfähigem Zustand zu gewinnen, wobei eine Beschädigung der Membran für die nachfolgenden Arbeiten nur von Vorteil war. Daß die Zellmembranen durch die Collagenasebehandlung permeabel geworden waren, konnte insofern angenommen werden, da die durch Kurzzeitinkubation gewonnenen Zellen nicht auf ATP-Zugabe reagierten.

Über die bei der Kontraktion der isolierten Zellen festgestellten Veränderungen der Zelloberfläche können nur Vermutungen angestellt werden. Die aus Abb. 5 ersichtlichen Unregelmäßigkeiten könnten als durch eine Komprimierung der Zellmembran verursachte Falten gedeutet werden. Andererseits könnte aber auch der gesamte Kontraktionsprozeß als ein Vorgang der Faltung, den die Membran mitvollzieht, angesehen werden, was aber rückblickend auf das Kontraktionsverhalten der Fibrillen, d.h. der glycerinierten Zellen, unwahrscheinlich ist. Möglicherweise sind die Oberflächenveränderungen als Aufwölbungen zu sehen, welche durch die veränderte Oberflächen-Volumenrelation der kontrahierten Zelle zu erklären wären. Ähnliche blasenartige Evaginationen der Zellmembran wurden auch von Fay & Delise (1973) an kontrahierten Muskelzellen der glatten Vertrebratenmuskulatur beobachtet.

Geht man davon aus, daß sich das Volumen einer Muskelzelle bei der Kontraktion nicht ändert, so mag es zu-

nächst erstaunen, daß keine deutliche Verbreiterung der Zellen nach der Kontraktion festgestellt wurde. Doch bei der flachen bandförmigen Gestalt der Zellen würde eine Verdrei- bis Vervierfachung der Zelldicke nach der Kontraktion - welche lichtmikroskopisch bei Aufsicht nicht auffällig wäre - ausreichend, um bei Verkürzung eine Volumenkonstanz zu gewährleisten.

Die isolierten Zellen kontrahierten bis auf 25 % ihrer Ausgangslänge. Eine so extreme Verkürzung der Längsmuskelzellen des Regenwurms scheint auf dem Hintergrund ihrer Herkunft durchaus realistisch. Sowohl der ganze Wurm als auch einzelne Segmente sind zu derartigen Längenverkürzungen befähigt.

Unter diesem Aspekt scheint die von Lanzavecchia (1977) vorgeschlagene Klassifizierung der schräggestreiften Muskulatur als modifizierter quergestreifter Muskel nicht treffend. Das Endstadium der Kontraktion von Fibrillen des quergestreiften Skelettmuskels ist schon bei 60 % der Ausgangslänge erreicht. Unter den Prämissen der Theorie der gleitenden Filamente ist auch keine weitere Verkürzung zu erwarten. Wenn sich die Z-Scheiben eines Sarkomers soweit einander genähert haben, daß sie in Kontakt mit den Myosin-Filamenten stehen, ist unter physiologischen Bedingungen der maximale Kontraktionszustand erreicht. Auch der schräggestreifte Muskel weist geordnete Sarkomere auf, doch die bereits demonstrierte Fähigkeit der Zellen, derart stark zu kontrahieren, ist schwerlich allein auf eine Sarkomerverkürzung im Sinne der Gleithypothese der Filamente zurückzuführen. Über den realen Verkürzungsgrad der einzelnen Sarkomere des schräggestreiften Muskels lassen sich keine genauen Angaben machen, da ihre tatsächliche Länge nicht bekannt ist. Die Länge der Myosin-Filamente wird zwischen 3 µm (Rosenbluth, 1968) und 9,5 µm (Knapp & Mill, 1971) ge-

schätzt. Solche Diskrepanzen sind dadurch zu erklären, daß die Schnittführung durch genau zwei zu einem Sarkomer gehörende Z-Stäbe und die dazwischenliegenden Myosin-Filamente relativ unwahrscheinlich ist. In jedem Fall müßten für die Möglichkeit einer stärkeren Kontraktionsfähigkeit als sie für das Sarkomer des Skelettmuskels bekannt ist, wegen der Längenkonstanz der einzelnen Filamente die I-Banden außergewöhnlich breit, d.h. die dünnen Filamente überdimensional lang sein. Demzufolge wären die die Schrägstreifung der Zelle ausmachenden A-Banden relativ weit voneinander entfernt. Weiterhin wäre mit einer Sarkomerverkürzung keine Änderung des Winkels der Schrägstreifen zur Längsachse der Zelle verbunden, wie sie bei der Kontraktion auftritt.

Aus diesen Überlegungen mag deutlich werden, daß die Forderung nach der Existenz eines zweiten Kontraktionsmechanismus durchaus berechtigt und realistisch ist. Nur durch das Gleiten der in der xz-Ebene (Abb. 2 d) gestaffelt übereinanderliegenden Myosin-Filamente gegeneinander ist die starke Längenverkürzung der Zellen und die Änderung des Winkels der Schrägstreifung zu erklären.

Wenn man das Sarkomer als funktionelle Einheit betrachtet, in welcher sich die Mechanismen manifestieren, die die Hypothese der gleitenden Filamente postuliert, so stellt sich die Frage nach der strukturellen Grundlage für den Mechanismus des Scherens der Myosin-Filamente (Abb. 38). Die Arbeiten mit den glycerinierten Zellen des Regenwurmmuskels leisten einen Beitrag zur Beantwortung dieser Frage.

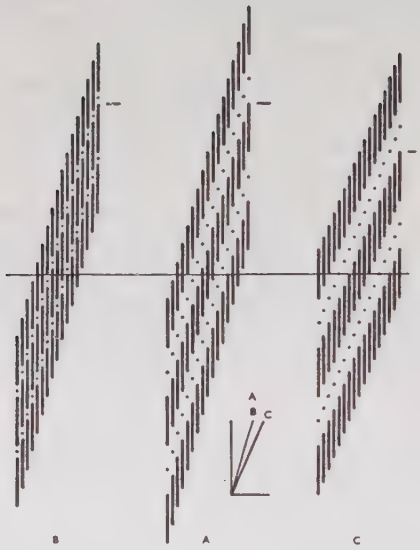


Abb. 38: (aus Knapp & Mill, 1971) Modell zur Verdeutlichung der beiden möglichen Mechanismen bei der Kontraktion einer schräggestreiften Muskelfaser in der xz-Ebene: ausgehend vom unkontrahierten Zustand in A ist in B die Verkürzung der Sarkomere durch den Mechanismus der gleitenden Filamente und in C das Scheren der Myosin-Filamente dargestellt. Die senkrechten Linien entsprechen den Myosin-Filamenten, die Punkte den quergeschnittenen Z-Stäben. Der Winkel der Schrägstreifung ist übertrieben; bei A und B ist er gleich, bei C hat er zugenommen.

Die Strukturen, welche die Schrägstreifung der Muskelzellen ausmachen und welche durch Glycerinierung voneinander getrennt werden und darauffolgend noch zur Kontraktion gebracht werden konnten, wurden bei der Darstellung der Ergebnisse als Fibrillen bezeichnet. Lanzavecchia (1977) hält diese Bezeichnung für unpassend, da die Linien, welche die Schrägstreifung hervorrufen, den A-Banden des querge-

streiften Muskels entsprechen. Trotzdem scheint es gerechtfertigt, diese Bezeichnung unter funktionellem Aspekt zu übertragen, nämlich unter der Voraussetzung, daß Myofibrillen allgemein als die kontraktilen Funktionseinheiten eines Muskels angesehen werden können.

Im Rahmen der Diskussion um die beiden Kontraktionsmechanismen im schräggestreiften Muskels ist es allerdings eine Notwendigkeit, sich den Unterschied zwischen den als Fibrillen bezeichneten kontraktilen Funktionselementen der beiden unterschiedlichen Muskeltypen zu verdeutlichen. Die Fibrille des quergestreiften Skelettmuskels stellt eine Kette von in Faserlängsrichtung aneinandergereihten Sarkomeren dar. Die einzelnen Sarkomere sind jeweils durch scheibenförmige Z-Elemente begrenzt, woraus die zylindrische Form der Fibrille resultiert. Die Fibrille des schräggestreiften Muskels jedoch besteht aus einzelnen Sarkomeren vieler versetzt übereinanderliegender flächiger Sarkomerbänder. Dadurch liegen die Z-Elemente nicht wie beim quergestreiften Muskel innerhalb der Fibrille, sondern begrenzen sie seitlich. Dies verdeutlicht die in Abb. 2 d dargestellte Schemazeichnung.

Bei den durch die Glycerinierung der Zellen isolierten Fibrillen war durch die Extraktion der Z-Elemente und ihr anschließendes Auseinanderweichen die strukturelle Grundlage für eine Sarkomerverkürzung eliminiert. So stellten die durch die Glycerinbehandlung erhaltenen Fibrillen ein Modellsystem dar, durch welches eine Trennung der beiden Kontraktionsmechanismen gelang. Als vorherrschender Prozeß bei der Verkürzung der Fibrillen kann der Schermechanismus, das Gleiten der Myosin-Filamente gegeneinander angesehen werden.

Zwischen dem Kontraktionsverhalten der glycerinierten und unglycerinierten Zellen bestand kein wesentlicher Unterschied und es wurde die Schlußfolgerung gezogen, daß die Verkürzung der intakten, unbehandelten Zelle auf einer Kontraktion ihres Fibrillengerüsts beruht. Auch bei nicht glycerinierten Zellen wurden manchmal an den Enden austretende Fibrillen festgestellt. Dies mag als weiterer Hinweis dafür gelten, daß auch im nativen Zustand die Strukturen der Fibrillen größere Konstanz und damit eher funktionelle Bedeutung haben als die Sarkomerbänder.

Die dargestellten Überlegungen erfolgten auf dem Hintergrund des Versuchs, die beiden Kontraktionsmechanismen getrennt zu betrachten und auf bestimmte Filamentkonstellationen zu beschränken. Die resultierende Aussage wäre: Der Schermechanismus bewirkt die Fibrillenverkürzung und der Mechanismus der gleitenden Actin- und Myosin-Filamente bewirkt die Sarkomerverkürzung. Daraus müßte gefolgert werden, daß letzterer für die Kontraktion des schräggestreiften Muskels von nur untergeordneter Bedeutung wäre, was jedoch auf der allgemein anerkannten Grundlage der Muskelkontraktion sehr unwahrscheinlich ist. Es gilt als gesichert, daß die Verkürzung der Sarkomere - bestehend aus Actin- und Myosin-Filamenten - darauf beruht, daß sich die dünnen und die dicken Filamente ohne Längenänderung gegeneinander verschieben (Huxley & Niedergerge, 1954). Mit der Längenreduktion der gesamten Einheit geht dadurch ein höherer Überlappungsgrad von Actin- und Myosin-Filamenten einher. Dies gilt wahrscheinlich nicht nur für den quergestreiften Muskel, sondern auch für die glatte Muskulatur oder für noch weniger hoch organisierte Systeme, wie sie nicht muskulären Bewegungsvorgängen zugrunde liegen.

Eine derzeitige Modellvorstellung vom kontraktilen Apparat des glatten Muskels (zusf. Darst. Small & Sobieszek, 1980) postuliert kontraktile Einheiten bestehend aus dicken und dünnen Filamenten, deren Enden am Plasmalemma der spindelförmigen Zelle durch Verankerungspunkte befestigt sind. Eine hypothetische Linie durch diese Punkte hätte die Form einer um die Zelle herumlaufenden Helix. Durch die infolgedessen schräg zur Zellängsachse laufenden kontraktilen Einheiten ergäben sich eindeutig Parallelen mit der Organisation der schräggestreiften Muskulatur. Ein grundlegender Unterschied bestünde jedoch in der Ausrichtung der Myofilamente, welche beim glatten Muskel als parallel zur Längsachse der jeweiligen Kontraktionseinheit angenommen werden, wohingegen sie beim schräggestreiften Muskel parallel zur Zellängsachse verlaufen. Doch dieser prinzipielle Unterschied sollte nicht unbedingt zum Anlaß für die Annahme völlig unterschiedlicher Kontraktionsmechanismen genommen werden. Der Winkel, den die Myofilamente der schräggestreiften Muskelzelle zur Fibrillenlängsachse einnehmen, ist mit 5 ^{o} im entspannten Muskel so gering, daß ein Ineinandergleiten von Actin- und Myosin-Filamenten, wie es für den glatten Muskel und alle übrigen zur Kontraktion befähigten Actomyosin-Systeme angenommen wird, durchaus für die Verkürzung der Fibrille verantwortlich gemacht werden kann (vgl. Abb. 10 a und b).

Am Beispiel des glatten Muskels sollte verdeutlicht werden, daß der Mechanismus der gleitenden Filamente auch dort wirksam werden muß und kann, wo keine geordneten Sarkomere, wie sie im quergestreiften Muskel vorliegen, anzutreffen sind.

Der Vergleich verschiedener schräggestreifter Muskeln in erschlafftem und kontrahiertem Zustand (zusf. Darst. Rosenbluth, 1972) zeigte, daß die dicken und dünnen Filamente aneinander vorbeigleiten, denn der Überlappungsgrad war in kontrahiertem Zustand größer als in erschlafftem. Außerdem wurden Querbrücken in Form von Myosin-Köpfen zwischen den beiden Filament-Typen gesehen. Somit gilt auch für die schräggestreifte Muskulatur die Interaktion von Actin- und Myosin-Filamenten als elementarer kontraktiler Prozeß.

Es wurde bereits festgestellt, daß bei der Kontraktion der durch Glycerinierung isolierten Fibrillen das Scheren der Myosin-Filamente als ausschlaggebender Vorgang angesehen wird. Durch die Experimente wurde gezeigt, daß diese Kontraktion ein ATP-verbrauchender Prozeß war. Diese Tatsache, und die vorangegangene Argumentation hinsichtlich der Kontraktionsfähigkeit von nicht sarkomerförmigen Einheiten, läßt den Schluß zu, daß dieses Scheren der Myosin-Filamente eine Interaktion von Actin- und Myosin-Filamenten beinhaltet. Dies ist durchaus denkbar, wenn man davon ausgeht, daß die Myosin-Filamente einer Sarkomerkette die Möglichkeit haben, mit den Actin-Filamenten der benachbarten Sarkomerkette zu interagieren.

Unter diesem Aspekt wäre eine Einordnung des schräggestreiften Muskels in die Nähe der glatten Muskulatur erneut vorzunehmen. Die frühere Bezeichnung 'helicaler glatter Muskel' resultierte aus der noch lückenhaften Vorstellung von der Filament-Organisation. Doch jetzt schiene diese Bezeichnung wieder zutreffend, basierend auf der Annahme, daß die Kontraktionsmechanismen, die im schräggestreiften Muskel wirksam werden, eher denen des glatten Muskels ähneln als denen des quergestreiften, d.h. daß die Prozesse des Gleitens der Filamente unabhängig von Sarkomeranordnungen ablaufen können.

Es stellt sich natürlich die Frage, warum im schräggestreiften Muskel überhaupt eine sarkomerähnliche Anordnung der Myofilamente vorliegt, wenn sie für den Grundprozeß der Kontraktion nicht unbedingt notwendig ist. Eine Funktion der Sarkomere könnte eine gewisse Richtungsgebung innerhalb der Gesamtkontraktion der Zelle sein, denn sie laufen parallel zur Faserlängsachse und gezwungenermaßen laufen parallel zu ihnen auch die an sie gebundenen Gleitbewegungen der Filamente ab. Die Fähigkeit zu großen Längenänderungen, welche die schräggestreifte Muskulatur für Tiere ohne Endo- oder Exoskelett so vorteilhaft macht, ist hauptsächlich in einer Änderung des Überlappungsgrades der Myosin-Filamente innerhalb der A-Banden (xz-Ebene) zu sehen. Dabei führt eine starke Dehnung nicht zu einer Störung der Organisation des Muskels. Dies könnte ein Verdienst der Sarkomerbänder sein, da diese als solche erhalten bleiben (yz-Ebene) und unbeeinflußt von den Verschiebungsbewegungen stabilisierend wirken können. So wäre auch die Funktion der Z-Stäbe, ohne die die Sarkomere als solche nicht bestünden, mitbegründet.

Weiterhin wäre es möglich, daß durch die Z-Elemente der Organisationsgrad des Muskels innerhalb der Entwicklung mitbestimmt wird, daß von dort aus gerichtetes Filament-Wachstum stattfinden kann. Nach Angaben von Kawaguti & Ikemoto (1959) sind es die sog. J-particles, die bei der Myogenese des Regenwurms zuerst nachweisbar sind.

Derartige Äußerungen zur Funktion der Sarkomere und Z-Stäbe sind rein spekulativ. Im Vordergrund der Bearbeitung derartiger Fragestellungen müßte eine Ermittlung der Bestandteile dieser Z-Elemente und ihrer Lösungseigenschaften sein. Als vorherrschende Aufgabe bei weiterführenden Untersuchungen wird eine Analyse der Art der Interaktion der Myofilamente innerhalb der Sarkomere und der Fibrillen angesehen.

Sowohl durch den kompetitiven Actin- bzw. Myosin-Bindungstest als auch durch die Funktionstests mit den isolierten Actin- bzw. Myosin-Fraktionen konnte eindeutig gezeigt werden, daß der Regenwurm *Lumbricus terrestris* L. wie die meisten Wirbellosen eine somatische Muskulatur besitzt, die dual reguliert ist, also sowohl am Actin als auch am Myosin Ca-regulatorisch aktive Proteine aufweist. Zur Isolierung eines Actomyosins sowie seiner Einzelkomponenten Actin und Myosin wurde immer der gesamte Hautmuskelschlauch verwendet, ohne daß eine Trennung von Ring- und Längsmuskulatur vorgenommen wurde. Trotzdem kann die Möglichkeit ausgeschlossen werden, daß durch die Vereinigung zweier jeweils nur ein Regulationssystem besitzenden Actomyosine aus den verschiedenen Muskellagen der Gesamteindruck einer dualen Regulation vermittelt worden wäre. In einem solchen Fall wäre nahezu die Hälfte oder mehr des Myosins und eine entsprechende Menge des Actins nicht mit Ca-regulatorisch aktiven Proteinkomponenten ausgestattet, was sich auf den Grad der Ca-Sensitivität des gesamten Actomyosins auswirken würde. Vorausgesetzt, daß die Extraktionseigenschaften der regulierten und unregulierten Komponenten gleich wären, ließe sich die ATPase-Aktivität nicht in so hohem Maße (Abb. 12 und Tabelle 1) durch die Abwesenheit von Ca hemmen, da immer noch genügend nicht Ca-sensitives Actomyosin in der Mischung vorhanden wäre.

Die isolierte Thin-filament-Fraktion war ebenso Ca-regulatorisch aktiv wie das isolierte Myosin. Hybride Actomyosin-Systeme mit den entsprechenden nicht Ca-sensitiven Myosin- und Actin-Komponenten des Skelettmuskels zeigten eine 80 - 90 %ige Ca-Sensitivität (Abb. 13 und 14). Diesen Grad an Ca-Sensitivität zeigte auch das Gesamt-Actomyosin des Regenwurms (Abb. 12, Tabelle 1). Dies widerspricht der Auffassung von Lehman (1976), daß die gesamte Ca-Sensitivität eines Actomyosins durch die Anwesenheit von zwei

Regulationssystemen gesteigert wird. Die isolierten Regulationssysteme von *Limulus* und *Locusta* hatten nämlich eine geringere Ca-Sensitivität gezeigt als die unfraktionierten Actomyosine (Lehman et al., 1974; Lehman & Szent-Györgyi, 1975). Es könnte sein, daß die von Lehman (1976) gezogene Schlußfolgerung nur eingeschränkt auf bestimmte Spezies zutreffend ist, oder aber sie kam, was wahrscheinlicher ist, aufgrund von präparationsbedingtem Verlust an Ca-Sensitivität der Einzelsysteme zustande. Für die Regenwurmmuskulatur trifft diese Annahme jedenfalls nicht zu, da sowohl mit den isolierten Systemen als auch mit dem nativen Actomyosin gleiche Werte für die Ca-Sensitivität (80 - 90 %) ermittelt wurden.

Umso zwingender stellt sich die Frage nach dem Grund für das Vorhandensein von zwei gleichwertigen Regulationssystemen innerhalb eines Muskeltyps, von denen jedes allein in der Lage ist, bei Ca-Abwesenheit die Actin-Myosin-Interaktion zu verhindern. In diesem Zusammenhang wurde versucht, zu klären, ob die beiden isolierten Regulationssysteme sich in der Abhängigkeit ihrer ATPase-Aktivitäten von der Ca-Konzentration unterschiedlich verhalten.

Beim Vergleich der Ca-Abhängigkeit der beiden Regulationssysteme des Regenwurmmuskels fiel auf, daß das hybride Actomyosin bestehend aus der Thin-filament-Fraktion des Regenwurms und dem Myosin des Skelettmuskels (Abb. 15) immer eine starke Aktivierung durch Ca innerhalb eines relativ kleinen Ca-Konzentrationsbereichs von 3×10^{-8} bis 10^{-7} M zeigte, und daß diese Steigerung der ATPase-Aktivität deutlich von der KCl-Konzentration abhängig war. War in einem synthetischen Actomyosin das Myosin des Regenwurms anwesend (Abb. 16), so verhielt sich dieses System entweder wie das oben beschriebene, oder aber das Aktivitätsmaximum der ATPase war nicht mehr von der KCl-Konzentration abhängig. Dabei erfuhr die Myosin-Komponente, welche in ihrer Aktivierung durch Ca unabhängig von der KCl-Kon-

zentration war, die maximale Aktivierung der ATPase-Aktivität erst nach Änderungen der Ca-Konzentrationen innerhalb eines relativ weiten Bereichs (von 9×10^{-8} bis 10^{-6}). Der Kurvenverlauf hatte deutlich an Steilheit verloren (Abb. 16). Dieser Effekt wurde auch bei der Rekombination beider Systeme aus Regenwurmmuskulatur festgestellt (Abb. 17). Ebenfalls einen flachen Anstieg der sigmoiden Kurven ergab die Ca-Aktivierung der rohen Actomyosin-Fraktionen (Abb. 12). Das Gesamt-Actomyosin des Regenwurms, welches neben dem unfraktionierten Bestand an Actin und Myosin auch noch Paramyosin enthielt (womit auch die auf die Gesamtproteinmenge bezogene relativ geringe ATPase-Aktivität zu erklären ist), wurde ebenfalls erst durch größere Änderungen in der Ca-Konzentration aktiviert und diese Aktivierung der ATPase-Aktivität war in ihrem Maximalwert auch nahezu unabhängig von der KCl-Konzentration.

Im folgenden wird zunächst auf die Deutung der Ca-Aktivierungskurven bezüglich des zur Aktivierung notwendigen Ca-Bereichs eingegangen werden und dann auf die Wirkung der verschiedenen Salzkonzentrationen.

Das Troponin des Kaninchen-Skelettmuskels bindet vier Ca. Nur zwei Bindungstellen sind allerdings Ca-spezifisch und für die Vermittlung des Ca-Signals von Bedeutung (Potter & Johnson, 1982). Lehman und Mitarbeiter führten Ca-Bindungsmessungen an Fraktionen nativer Actin-Filamente verschiedener Wirbelloser durch und stellten fest, daß die regulierten Actin-Filamente von Vertebraten vier- bis achtmal soviel Ca binden wie diejenigen Wirbelloser. Am nativen Actin von *Limulus* wurde ermittelt, daß es bezogen auf die dünnen Filamente des Kaninchen-Skelettmuskels halb soviel Ca bindet und für die Actin-Filamente von *Lumbricus* ergab sich nur ein Drittel der Ca-Menge, welche von Kaninchen-Actin gebunden wird (Lehman et al., 1972).

Bei einem Vergleich der Ca-Aktivierungskurven von Actomyosinen verschiedener Zusammensetzung und unterschiedlichen Ursprungs der Proteine zeigten Lehman & Szent-Györgyi (1975) Abweichungen in der Steilheit auf. Durch nur geringfügige Änderungen der Ca-Konzentration wurde ein sprunghafter Anstieg der ATPase-Aktivität von Kaninchen-Actomyosin festgestellt, wohingegen die dünnen Filamente des dual regulierten *Limulus*-Muskels hybridisiert mit Kaninchen-Myosin einen flacheren Kurvenverlauf hervorriefen. Die Reaktion des Actin-gekoppelten Regulationssystems von *Limulus* innerhalb weitreichender Änderungen der Ca-Konzentration (flache Kurve) tritt nur in Verbindung mit unreguliertem Kaninchen-Myosin auf. Für die dual regulierten Myofibrillen dieses Arthropoden fanden Lehman & Szent-Györgyi (1975) eine Aktivierung der ATPase durch nur geringe Änderungen der Ca-Konzentration (steile Kurve).

Die isolierten Protein-Fraktionen der Regenwurmmuskulatur verhielten sich im Gegensatz dazu gerade umgekehrt, denn sowohl die Thin filaments als auch das Myosin können zusammen mit den entsprechenden unregulierten Komponenten des Wirbeltier-Skelettmuskels einen steilen Anstieg der ATPase-Aktivität bewirken. Dahingegen reagierte das Gesamt-Actomyosin des Regenwurms nur auf weitreichende Änderungen der Ca-Konzentration. Der flache Anstieg dieser Kurve wird offenbar durch die Myosin-Komponente bewirkt.

Für Lehman & Szent-Györgyi (1975) weist der flache Anstieg der Ca-Aktivierungskurve bei Verwendung von reguliertem *Limulus*-Actin auf das Vorhandensein einzelner, nicht kooperativer Ca-Bindungsstellen hin. Nach dem Vergleich der unterschiedlichen Mengen an Ca, welche von Vertebraten- und Evertebraten-Actin gebunden werden, äußert Lehman (1976) die allgemeine Feststellung, daß

sich das "An- und Ausschalten" der Actin-Filamente (vgl. Kap. III. 4.1) beim Skelettmuskel in einem viel engeren Ca-Konzentrationsbereich vollzöge als bei den meisten untersuchten Muskeln der Wirbellosen, woraus ein steiler Anstieg der Ca-Aktivierungskurven resultiere. Erst das Zusammenwirken der beiden Regulations-Systeme des Evertebraten *Limulus* ermöglichte eine Aktivierung der ATPase-Aktivität durch nur geringe Änderung der Ca-Konzentration (steile Kurve).

Der steile Anstieg der Ca-Aktivierungskurven der hybridisierten Actomyosine (Abb. 15 und 16) und des synthetischen Regenwurm-Actomyosins (Abb. 17) bei 20 mM KCl läßt auf kooperative Effekte schließen, denn auch bei linearer Auftragung ergibt sich ein sigmoider Kurvenverlauf. Die Kurven des Gesamt-Actomyosins (Abb. 12) jedoch, sowie die bei 80 mM KCl erhaltenen Kurven der hybridisierten und synthetischen Actomyosine deuten eher auf das Vorhandensein nicht kooperativer Ca-Bindungsstellen hin. Daher könnte vermutet werden, daß sowohl die Anwesenheit von Paramyosin (im Gesamt-Actomyosin) als auch die Erhöhung der Ionenstärke (von 20 mM auf 80 mM KCl) einen Einfluß auf den kooperativen Effekt, den Ca auf die Actomyosin-ATPase ausübt, haben könnten, sowie auf die Affinität der Systeme für Ca (Verschiebung der Kurven in Bereiche höherer Ca-Konzentrationen).

Rückschlüsse auf die Ca-Bindung der jeweiligen Actin- oder Myosin-Komponente eines Actomyosin-Systems lassen sich jedoch durch derartige Ca-Abhängigkeitskurven nur mit Einschränkung ziehen. Sie müssen hypothetisch bleiben, da hier ein indirektes Meßverfahren vorliegt, bei welchem auch noch andere, hier nicht berücksichtigte Effekte auf die ATPase-Aktivität auftreten. Kinetische Messungen sind an Actomyosinen mit intaktem Myosin, im Gegensatz zu seinen löslichen Spaltprodukten HMM und SF1 gar nicht möglich (Eisenberg & Moos, 1967; 1970).

Für eine fundierte Deutung der in Kap. III. 2.2.4 dargestellten Ca-Abhängigkeitskurven der Regenwurm-Proteine sind daher Messungen der Ca-Bindung sowohl der dünnen Filamente und des Troponin-C und vor allem auch der verschiedenen Myosin-Präparationen geplant. Es hat sich bereits durch erste Messungen gezeigt, daß das Myosin von *Lumbricus* pro Myosin-Kopf je ein Ca mit hoher Spezifität in einem Ca-Konzentrationsbereich von 10^{-7} bis 10^{-6} M bindet (D'Haese, unveröff.).

Es ist durch Untersuchungen am Vertebraten-Skelettmuskel bekannt, daß bei steigenden Salzkonzentrationen die Bindungskonstante von Myosin zum Actin abnimmt, was zu einer Verminderung der ATPase-Aktivität führt (Eisenberg & Moos, 1970). Im Hinblick auf die Ca-Regulation hat sich gezeigt, daß die Myosin-gekoppelte Regulation bei schnellen Decapoden-Muskeln und ebenso bei Myofibrillen des Vertebraten-Skelettmuskels nur dann nachweisbar war, wenn die Salzkonzentration von 20 auf etwa 100 mM NaCl erhöht wurde (Lehman, 1977). Diese Abhängigkeit der regulatorischen Fähigkeiten von der Salzkonzentration wurde so gedeutet, daß bei einer unphysiologisch niedrigen Ionenstärke zwar die ATPase-Aktivität erhöht wird, aber durch diese schnelle Interaktion die Möglichkeit verloren geht, das Ca-Signal zu verarbeiten. Erst wenn die ATPase-Aktivität sinkt, also bei geringerer Bindung des Myosins an das Actin, kann eine Modulation der Actin-Myosin-Interaktion über Ca erfolgen.

Es wurde deshalb das Gesamt-Actomyosin des Regenwurms und die isolierten Komponenten in synthetischen und hybridisierten Actomyosinen hinsichtlich ihrer regulatorischen Fähigkeiten in Abhängigkeit von der Ionenstärke getestet. Dabei zeigte sich, daß bei höheren Salzkonzentraktionen der für eine Aktivierung notwendige Konzentrationsbereich an Ca-Ionen größer als bei niedriger Ionen-

stärke war. Weiterhin wurde deutlich, daß die Myosin-Fraktion nicht einheitlich in ihrer Reaktion auf Veränderungen der Ionenstärke war: es wurden KCl-abhängige und KCl-unabhängige Fraktionen gefunden. In allen Fällen wurde dieses Verhalten auf das Actomyosin übertragen, unabhängig davon, ob diese Fraktion mit unreguliertem Actin hybridisiert oder mit der Thin-filament-Fraktion rekombiniert wurde. Durch den Vergleich der Myosin-Fraktionen in der SDS-PAGE, wo keine deutlichen Unterschiede im Bandenmuster der leichten Ketten der Myosine festgestellt werden konnten, läßt sich ausschließen, daß das unterschiedliche Verhalten der Myosin-Fraktionen auf eine unterschiedliche Zusammensetzung an Isoenzymen zurückzuführen ist.

Die Versuche haben ergeben, daß die beiden Regulationssysteme auf verschiedene Salzkonzentrationen in unterschiedlicher Weise reagieren können. Dabei spielen offenbar verschiedene Zustandsformen der Myosin-Komponente eine entscheidende Rolle. Wodurch diese Unterschiede in der Myosin-Fraktion hervorgerufen werden, die schließlich zu einer unterschiedlichen Reaktion des Actomyosins auf das Ca-Signal führen, ist bisher unbekannt. Da dieses Verhalten möglicherweise von funktioneller Bedeutung für die duale Regulation ist, müßte es weiterhin untersucht werden.

Es wurde der Versuch unternommen, aus der Regenwurmmuskulatur ein Tropomyosin-ähnliches Protein zu isolieren und es in der gewonnenen Proteinfraktion als solches zu identifizieren und sowohl strukturell als auch funktionell zu charakterisieren. In seinen Reinigungseigenschaften wies das Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur Übereinstimmungen mit dem entsprechenden Protein des Skelettmuskels auf. Hierbei war am auffälligsten seine Beständigkeit gegen organische Lösungsmittel, auf welcher die Präparationsmethode von Bailey (1948) beruht, sowie die isoelektrische Präzipitation im pH-Bereich um 4,6. Ein unterschiedliches Verhalten bei der Ammoniumsulfat-Präzipitation wurde schon bei früheren Untersuchungen festgestellt (Ditgens, 1979). Dies steht in Einklang mit der Feststellung von Woods & Pont (1971), die beim Vergleich der Tropomyosine der Schwanzmuskulatur von zwei Krebsarten (*Jasus lalandei* und *Cherax destructor*),des weißen und gelben Teils des Adduktormuskels der Auster (*Crassostrea commercialis*) und der Fußmuskulatur des Seeohrs (*Notohaliotis ruber*) fanden, daß diese Evertrebaten-Tropomyosine innerhalb des Ammoniumsulfat-Sättigungsbereichs von 30 - 40 % präzipitierten. Dies ist die Fraktion, welche bei der Reinigung von Tropomyosin der Skelettmuskulatur (Hartshorne & Mueller, 1969) verworfen wird.

Bei den eigenen Versuchen hatte sich überraschenderweise herausgestellt, daß das unfraktionierte Roh-Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur aus vier verschiedenen Komponenten bestand, welche sich geringfügig in ihrem isoelektrischen Punkt und ihrer Mobilität in der SDS-PAGE unterschieden (Abb. 18). In der Skelettmuskulatur von Säugetieren liegen nur zwei verschiedene Tropomyosin-Untereinheiten vor, welche als α- und β-Kette bezeichnet werden (Cummins & Perry, 1973, 1974). Nach rezenteren Untersuchungen besteht allerdings Grund zu der Annahme, daß

die α-Ketten verschiedener Muskeltypen eine gewisse Heterogenität durch Unterschiede in der Aminosäuresequenz aufweisen (Bronson & Schachat, 1982). Für das gesamte Tropomyosin-Molekül ergeben sich drei Kombinationsmöglichkeiten, welche auch tatsächlich in verschiedenen Muskelgeweben nachgewiesen wurden: αα-, αβ- und ββ-Tropomyosin.

Das native Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur hat, wie alle bekannten Tropomyosine aus Muskelgewebe, ein Molekulargewicht von etwa 70.000, was durch Gelfiltration gezeigt worden war. Hieraus folgt, daß ein Tropomyosin-Molekül aus zwei identischen oder verschiedenen Untereinheiten der vier vorliegenden besteht. Hinweise auf ihre Kombination lieferten die Ergebnisse der säulenchromatographischen Trennungsversuche.

Die Ionenaustauscher-Chromatographie des Roh-Tropomyosins der Regenwurmmuskulatur hatte eine Auftrennung in zwei Fraktionen ergeben, welche jeweils aus zwei Komponenten bestanden. Die Untereinheiten der beiden Tropomyosin-Fraktionen dissoziierten erst in Gegenwart von Harnstoff und ließen sich dann durch Ionenaustauscher-Chromatographie trennen. Aufgrund dieser Trennungseigenschaften wurde angenommen, daß in der Regenwurmmuskulatur zwei Isoformen von Tropomyosin vorliegen, welche als zwei Paare von insgesamt vier unterschiedlichen Monomeren auftreten.

Die dimeren Isoformen des Skelettmuskel-Tropomyosins lassen sich durch Adsorptionschromatographie in Anwesenheit von 1 M KCl voneinander trennen. Jedoch ist die Trennung der Ketten voneinander, d.h. die Auftrennung der dimeren Formen in Monomere, nur in Anwesenheit von Harnstoff möglich (Eisenberg & Kielley, 1974; Cummins & Perry, 1973).

Allein die Existenz von vier Tropomyosin-Untereinheiten macht ihre Benennung nach der beim Skelettmuskel-Tropomyosin üblichen Weise unmöglich. Doch es wurde versucht, nach den dort geltenden Unterscheidungskriterien Hinweise auf eine Klassifizierung der vier Untereinheiten zu erhalten. Die α- und β-Ketten des Skelettmuskel-Tropomyosins haben die gleiche Länge und bestehen jeweils aus 284 Aminosäureresten (Mak et al., 1980), unterscheiden sich jedoch geringfügig in ihrer elektrophoretischen Mobilität. Diese Unterschiede in der Mobilität lassen allerdings nicht unbedingt Rückschlüsse auf das tatsächliche Molekulargewicht zu, sondern sie können auch durch Unterschiede in der Aminosäurezusammensetzung und damit der Ladung verursacht werden (Lehrer, 1978). Bei der Trennung der Ketten durch CM-Cellulose-Chromatographie in Harnstoff wird zuerst die in der SDS-PAGE langsamer wandernde β-Kette eluiert (Cummins & Perry, 1973). Unter den leichten Abweichungen in der Aminosäurezusammensetzung wird als bedeutsam der Unterschied im Cysteingehalt hervorgehoben. Die α-Kette besitzt einen Cysteinrest bei Position 190, während die β-Kette zwei Cysteinreste aufweist, einen ebenfalls bei Position 190 und einen bei Position 36 (Mak et al., 1980). Alle drei Isoformen von Tropomyosin (αα-, αβ- und ββ-Tropomyosin) lassen sich durch Disulfidbrückenbildung über die SH-Gruppen der Cysteinreste der Positionen 190 intramolekular vernetzen, wodurch unter anderem gezeigt wurde, daß die beiden Ketten nicht gestaffelt, sondern in Register liegen (Johnson & Smillie, 1975; Lehrer, 1975, 1978).

Die Elutionsreihenfolge der Untereinheiten der beiden Tropomyosin-Formen des Regenwurmmuskels war hinsichtlich ihrer Mobilität im SDS-Gel umgekehrt. D.h. in beiden Fällen wurde zuerst die schneller wandernde Kette eluiert. Ebenso konnte nach den Versuchen, die Untereinheiten der dimeren Formen über Disulfidbrücken miteinander zu ver-

binden, keine Einordnung vorgenommen werden, da keine Vernetzung stattgefunden hatte.

Aus der Unfähigkeit beider Tropomyosin-Formen, Disulfidbrücken zu bilden, wurde geschlossen, daß, falls überhaupt Cysteinreste in den Ketten vorhanden sind, diese an unterschiedlichen Positionen liegen müssen.

Die Frage nach der Bedeutung der Cysteinreste für die Funktion von Tropomyosin innerhalb der Ca-Regulation der Muskelkontraktion, kann noch nicht schlüssig beantwortet werden. Nach Untersuchungen der dynamischen Konformationsänderungen von Tropomyosin (Lehrer et al., 1981), wird in Erwägung gezogen, daß der Konformationszustand bzw. der Grad der Flexibilität des Moleküls bei der Beeinflussung seiner Position auf dem Actin-Filament und der daraus resultierenden Art der Interaktion zwischen Actin und Tropomyosin eine Rolle spielen könnte. Beim Skelettmuskel-Tropomyosin ist die Region nahe dem Cysteinrest bei Position 190, wo das globuläre Troponin lokalisiert ist, diejenige Stelle, deren Beeinflussung in einem leichten Auseinanderweichen der Ketten resultiert, was wahrscheinlich eine Änderung der Bindungseigenschaften bezüglich des Actins nach sich zieht. Jedenfalls sind es lokale Beeinflussungen innerhalb einer ca. 80 Å breiten relativ labilen Region um die Position 190, welche sich auf die Konformation des gesamten Moleküls auswirken. Doch kann auf diesem Hintergrund nicht geschlossen werden, daß die Cysteinreste selbst innerhalb der zur Regulation notwendigen Konformationsänderungen des Tropomyosins eine fundamentale Rolle spielen, denn das Tropomyosin des Flußkrebs beispielsweise besitzt kein Cystein (Woods & Pont, 1969), scheint aber offensichtlich seine Funktion innerhalb der Actin-gekoppelten Regulation der betreffenden Muskulatur erfüllen zu können.

Bei ihrer Untersuchung des Regenwurm-Tropomyosins waren Crimmins et al. (1981) ebenfalls zu dem Ergebnis gekommen, daß dieses Tropomyosin nicht durch Disulfidbrücken zu vernetzten ist. Bei einer Messung des Cysteingehaltes kamen die Autoren zu einem Wert von 0,99 SH/Kette. Doch aufgrund des negativen Ergebnisses des Vernetzungsversuchs mit DTNB, wurde dieser Wert schließlich auf Verunreinigungen zurückgeführt und der Cysteingehalt des Regenwurm-Tropomyosins als null angesehen. Obwohl dieses Ergebnis mit den im Rahmen dieser Arbeit erhaltenen in Einklang gebracht werden kann, wird der Beurteilung des Regenwurm-Tropomyosins durch die oben genannte Untersuchung nur in eingeschränktem Maße Bedeutung beigemessen, da die Autoren nur zwei Tropomyosin-Untereinheiten in der Regenwurmmuskulatur gefunden hatten. Es könnte sein, daß innerhalb der Reinigungszyklen von isoelektrischer Präzipitation und Ammoniumsulfat-Fraktionierung im Bereich von 50 - 70 % Sättigung (!) Tropomyosin-Anteile verworfen wurden.

Die Existenz von zwei Tropomyosin-Formen mit insgesamt vier verschiedenen Untereinheiten innerhalb eines Muskeltyps weicht nicht nur stark von den oben dargestellten, für die Skelettmuskulatur der Wirbeltiere bekannten Verhältnissen ab. Auch für die Tropomyosine aus nichtmuskulären Geweben wie Blutplättchen und Gehirn (Cohen & Cohen, 1972; Fine & Blitz, 1975; Cohen 1982) sowie für alle bekannten Tropomyosine der glatten Wirbeltiermuskulatur (Dabrowska et al., 1980) und der Muskulatur von Wirbellosen (Regenstein & Szent-Györgyi, 1975; Woods & Pont, 1971), sind nur zwei identische oder zwei unterschiedliche Ketten bekannt.

Auf diesem Hintergrund waren zwei Fragen zu klären:
1. Handelt es sich bei den gefundenen Untereinheiten tatsächlich um vier verschiedene Protein-Komponenten,

oder sind die Abweichungen in isoelektrischem Punkt und Mobilität in der SDS-PAGE durch proteolytischen Abbau zu erklären? Falls wirklich zwei Fraktionen mit insgesamt vier verschiedenen Untereinheiten vorliegen, ergibt sich die zweite Frage: 2. Handelt es sich bei diesen beiden Fraktionen tatsächlich um Tropomyosin?

Zur ersten Frage ist zu bemerken, daß sowohl die Mobilität der Banden in der SDS-PAGE als auch das Auftreten von vier distinkten Punkten in der zwei-dimensionalen Elektrophorese immer wieder in gleicher Weise reproduziert werden konnte. Dies war unabhängig davon, ob ein gesamtes Actomyosin, ein rohes Tropomyosin, oder die isolierten Fraktionen, einzeln oder nachträglich gemischt, elektrophoretisch aufgetrennt wurden. Ebenso spielte es keine Rolle, auf welche Weise oder von welchem Präparationsstadium ausgehend die Tropomyosin-Darstellung stattgefunden hatte. Ob gesamtes Muskelhomogenat oder Actin-angereichertes Actomyosin verwendet wurde, ob Ethanol-Ether-getrocknetes Pulver hergestellt wurde oder nicht, ob die Extraktion mit KCl, LiCl oder NaCl erfolgte, es konnte immer das gleiche Erscheinungsbild in ein- oder zweidimensionaler Elektrophorese erreicht werden. Hieraus kann geschlossen werden, daß sich die vier gefundenen Tropomyosin-Untereinheiten tatsächlich in ihrem Molekulargewicht oder zumindest geringfügig in ihrer Aminosäurezusammensetzung unterscheiden. An dieser Stelle sei bemerkt, daß für die Molekulargewichtsangaben der einzelnen Tropomyosin-Untereinheiten die gleichen Einschränkungen gelten, wie sie für die Ketten des Skelettmuskel-Tropomyosins notwendigerweise gemacht werden (s.o., Lehrer, 1978).

Hinweise auf Unterschiede in der Aminosäuresequenz der beiden Tropomyosin-Formen (TM_1 und TM_2) wurden auch durch proteolytische Spaltung der Fraktionen nach der Methode

von Cleaveland et al (1977) mit *Staphylococcus aureus*-Protease erhalten. Nach Auftrennung der proteolytischen Spaltprodukte in der SDS-PAGE ergab sich bei den jeweiligen Tropomyosin-Typen (einschl. Skelettmuskel-Tropomyosin) ein unterschiedliches Bandenmuster.

Ein weiterer Beleg dafür, daß es sich bei den beiden Regenwurm-Tropomyosin-Formen um unterschiedliche Proteine mit jeweils sich voneinander unterscheidenden Komponenten handelte, wurde durch immunologische Methoden erbracht. Die Antikörper, welche gegen die beiden Tropomyosin-Formen, sowie gegen die getrennten Untereinheiten von $Tropomyosin_2$ in Kaninchen hergestellt worden waren, hatten sich als spezifisch erwiesen. Sie agglutinierten fast ausschließlich mit der bzw. den Proteinkomponenten, welche in hochgereinigter Form (Peakspitzen nach Säulenchromatographie) als Antigen verwendet worden waren. Dies wurde gezeigt, indem Nitrocellulose, auf welche nach der Methode von Towbin et al. (1979) ein elektrophoretisch aufgetrenntes Actomyosin transferiert worden war, mit den entsprechenden IgG-Fraktionen inkubiert wurde. Die Agglutination Antigen-Antikörper wurde durch ^{125}J-Protein-A mit anschließender Röntgenfilmexponierung sichtbar gemacht.

Um die vier Untereinheiten eindeutig voneinander abzugrenzen, ist im Rahmen weiterer Untersuchungen geplant, ihre Aminosäurezusammensetzung zu ermitteln.

Die in Punkt 2. angeführte Frage, ob es sich bei beiden isolierten Fraktionen (TM_1 und TM_2) tatsächlich um Tropomyosin handelt, wird beantwortet durch die eindeutige strukturelle und funktionelle Charakterisierung der beiden Fraktionen als Tropomyosin.

Beide Proteine der Regenwurmmuskulatur zeigten das für Tropomyosin typische Aggregationsverhalten. Es bildeten sich nadelförmige Parakristalle mit einer Bandenperiodizität, welche so gut wie identisch mit der des Tropomyosins der Kaninchen-Skelettmuskulatur war. Durch Röntgenstrahlen-Kristallographie wurde eine Länge des Skelettmuskel-Tropomyosins innerhalb der Filamente von Kristallen von 410,3 $\pm$ 1,4 Å ermittelt, woraus bei einer effektiven Länge des gesamten Moleküls von 423 Å eine Überlappung von 10 Å und damit 8 oder 9 Aminosäureresten resultiert (Phillips et al., 1980). Unter der Annahme, daß auch die Tropomyosin-Formen des Regenwurmmuskels eine ähnlich lange Überlappungszone haben, kann für sie die gleiche effektive Moleküllänge angenommen werden. In jedem Fall kann aus der Moleküllänge innerhalb der Filamente, welche aus der axialen Bandenperiodizität ersichtlich ist, geschlossen werden, daß auch die Tropomyosin-Formen des Regenwurms - wie das Tropomyosin des Skelettmuskels - sich über jeweils sieben Actin-Monomere erstrecken. Diese Feststellung gewinnt an Bedeutung, wenn bei funktionellen Tests Tropomyosin mit Actin des Kaninchen-Skelettmuskels hybridisiert wird, wobei der Bereich physiologischer Gewichtsverhältnisse angestrebt wird.

Unterschiede in Bandenmuster und Aggregationsform zwischen den beiden Tropomyosin-Formen des Regenwurms bieten sich zwar zur Abgrenzung der beiden Proteine gegeneinander an, doch in Hinblick auf die polymorphen Erscheinungsformen, die alleine das Tropomyosin$_1$ zeigte, scheint dies nicht sinnvoll. Die Parakristalle des Tropomyosin$_1$ traten mit mindestens vier verschiedenen Bandenmustern auf, weiterhin aggregierte es in Netzen mit sowohl quadratischer als auch hexagonaler Gitterstruktur. Bei einer derartigen Vielfalt an Aggregationsformen kann also die Art der Kristallbildung nicht zur Differenzierung der beiden Tropomyosin-Formen herangezogen werden. Doch

abgesehen vom Hinweis auf die Länge der Moleküle, gab die Fähigkeit beider Fraktionen zur Aggregation in derartigen Kristallformen den eindeutigen strukturellen Beleg für das Vorliegen von Tropomyosin.

Parakristalle von Evertebraten-Tropomyosinen wurden bereits von mehreren Autoren beschrieben (Tsao et al., 1965, Millward & Woods, 1970, Regenstein & Szent-Györgyi, 1975; Harris et al; 1977). Meist bildeten die untersuchten Tropomyosine keine periodischen Aggregate mit divalenten Kationen, sondern nur nach Präzipitation nahe dem isoelektrischen Punkt. Dies entspricht dem Aggregationsverhalten des rohen Regenwurm-Tropomyosins. Die Fähigkeit zur dicht gepackten periodischen Aggregation oder zur Bildung von Netzen bei leicht basischem pH und bei Anwesenheit von divalenten Kationen erlangte Regenwurm-Tropomyosin erst durch Reinigung und Trennung der Isoformen durch Ionenaustauscher-Chromatographie.

Bemerkenswerte Unterschiede zum Tropomyosin des Vertebraten-Skelettmuskels waren die Bildung von Netzstrukturen des Tropomyosin$_1$ bei leicht basischem pH und die in manchen Dialysaten auftretenden bandförmigen Parakristalle (Ditgens et al., 1982).

Die funktionelle Charakterisierung des Tropomyosins der Regenwurmmuskulatur erfolgte u.a. unter dem Aspekt seiner Troponin- und somit Ca-unabhängigen Effekte auf die Actin-Myosin-Interaktion. Es wurde gezeigt, daß es zwei für das Tropomyosin der Skelettmuskulatur charakteristische Eigenschaften besitzt: die Hemmung der Acto-HMM-ATPase bei normalen ATP-Konzentrationen und die Potenzierung der Acto-SF1-ATPase bei niedrigen ATP-Konzentrationen.

Die Veränderungen, welche hierbei auf dem Actin-Filament stattfinden und welche als Ursache der Beeinflussung der

Interaktion von Actin und Myosin angesehen werden, sind mit der Hypothese der sterischen Blockade (Haselgrove, 1972; Huxley, 1972) nicht eindeutig zu erklären, weil
a) kein Troponin anwesend ist, um Tropomyosin in der distalen Sperrstellung zu verankern und, weil
b) diese Theorie nur zwei mögliche Positionen von Tropomyosin auf dem Actin-Filament vorsieht, eine aktive und eine inaktive. Weniger unter dem Aspekt der Rolle des Tropomyosins innerhalb des Ca-Regulationsmechanismus als unter dem der kooperativen Interaktion von Tropomyosin und Actin, welche die Actin-Monomeren nicht mehr unabhängig voneinander reagieren läßt, postulieren Murray et al. (1980 b), daß Tropomyosin drei Hauptpositionen, korrelliert mit drei verschiedenen Aktivitätszuständen, auf dem Actin-Filament einnehmen kann:
1. die feste Bindung an der Peripherie des Filaments, was dem inaktiven, dem Erschlaffungszustand entspricht,
2. einen intermediären Zustand, bei dem Tropomyosin seine Position zwischen verschiedenen Bindungsstellen auf dem Actin-Filament variiert, was dem aktiven Zustand bei der Kontraktion entspricht und 3. die ausschließliche Fixierung des Tropomyosins in der Grube zwischen den Actin-Strängen, was dem potenzierten Zustand der erhöhten Aktivität entspricht (vgl. S. 127). Weiterhin beinhaltet das Modell ein Konkurrieren von Tropomyosin und Myosin um Bindungsstellen am Actin. Auf diesem Hintergrund können die Phänomene der Hemmung und der Potenzierung verstanden werden.

Wird Tropomyosin nicht durch Ca-freies Troponin in der peripheren Stellung auf dem Actin-Filament gehalten, verteilt es sich darauf im intermediären Zustand und konkurriert mit Myosin um Bindungsstellen am Actin. Daraus resultiert eine Hemmung der ATPase-Aktivität, welche im Falle des Skelettmuskel-Tropomyosins etwa 50 % ausmacht (Eaton et al., 1975). Der Grad der Hemmung ist aus rein

statistischen Gründen abhängig vom Verhältnis Tropomyosin : Myosin-Köpfe. Daher wird mit HMM oder SF1 gearbeitet, um sterische Hinderungen oder Aggregation von Myosin zu vermeiden.

Die durch beide Tropomyosin-Formen der Regenwurmmuskulatur hervorgerufene Hemmung war, wie Abb. 29 und 31 verdeutlicht, erheblich viel stärker als die durch das Tropomyosin der Skelettmuskulatur bewirkte. Wenn letztere durch eine diffuse Verteilung von Tropomyosin auf dem Actin-Filament gedeutet werden kann, so könnte gefolgert werden, daß die stärkere Hemmung durch Regenwurm-Tropomyosin auf seiner andersartigen Anordnung auf dem Actin-Filament beruht. Diese mag entweder einen höheren Grad an Besetzung von Myosin-Bindungsstellen bewirken, oder das Actin-Filament auf andere Weise beeinflussen, so daß die Affinität zwischen HMM und Actin herabgesetzt ist. Die Abhängigkeit des Grades der Hemmung von der HMM-Konzentration (Abb. 28) weist darauf hin, daß auch Myosin selbst imstande ist, die Actin-Tropomyosin-Interaktion durch seine Bindung zu verändern, was u. U. die Annahme von Murray et al. (1980 a b) bestätigt, daß die Hemmung mit einem Konkurrieren von Tropomyosin und Myosin um Bindungsstellen am Actin verbunden ist.

Die Bedeutung von Tropomyosin für die Interaktion von Actin und Myosin ist sicherlich differenzierter als weithin angenommen wird. Erst in den letzten Jahren wurden Effekte von Tropomyosin untersucht, die nicht in direktem Zusammenhang mit der Ca-Regulation stehen.

Im Gegensatz zu dem Hemmungseffekt, den Tropomyosin der Regenwurm- und der Skelettmuskulatur gemeinsam auf das Acto-HMM-System des Skelettmuskels ausüben, können bei Verwendung kontraktiler Proteine anderer Herkunft ganz unterschiedliche Auswirkungen auftreten. So hat z. B. das Tropomyosin der glatten Wirbeltiermuskulatur einen aktivierenden Einfluß auf das Acto-HMM und Actomyosin des

Skelettmuskels (Sobieszek & Small, 1977, 1981; Sobieszek, 1982) und umgekehrt steigert Skelettmuskel-Tropomyosin die ATPase-Aktivität von Tropomyosin-freiem Actomyosin aus glatter Muskulatur (Chacko et al., 1977; Hartshorne et al., 1977) ebenso wie die des hybriden Systems bestehend aus *Acanthamoeba*-Actin[+)] und Kaninchen-HMM (Yang et al., 1977). Aktivierend wirkt das Tropomyosin der Skelettkuskulatur auch auf die Actin-aktivierte Myosin-ATPase der dual regulierten Muskulatur von *Limulus* (Lehman & Szent-Györgyi, 1972) und *Lethocerus* (Lehman et al., 1974). Diese Variationen machen deutlich, daß neben den Eigenschaften der jeweiligen Myosin-Komponente auch die Eigenschaften des Tropomyosins ausschlaggebend für die Modulierung der Kinetik der Actin-Myosin-Interaktion sind.

In der vorangegangenen Darstellung wurde die Wirkung von Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur mit der des Tropomyosins des Skelettmuskels innerhalb des Acto-HMM-Systems der Skelettmuskulatur verglichen. Beide Tropomyosine hemmen die Acto-HMM-ATPase, wobei die durch das Skelettmuskel-Tropomyosin ausgeübte Hemmung mit 50 - 60 % weniger stark ist. Parallel hierzu wurde Regenwurm-Tropomyosin in einem System bestehend aus Skelettmuskel-Actin und Regenwurm-Myosin eingesetzt (Abb. 30). Es hatte keinen derartigen Einfluß, wie er beim Skelettmuskel-Acto-HMM aufgetreten war. Dieser Unterschied könnte auch in den Eigenschaften des Regenwurm-Myosins als Ca-regulatorisch aktive Komponente des dual regulierten Actomyosins dieses Wirbellosen zu suchen sein. Skelettmuskel-Tropomyosin übt allerdings auf das System seiner Herkunft, bestehend aus Skelettmuskel-Actin und intaktem Myosin (im Gegensatz zum Spaltprodukt HMM), auch keinen oder nur einen leicht hemmenden Effekt aus (Sobieszek & Small, 1981).

+) Actin isoliert aus der Amoebe *Actanthamoeba castellani*

Daher müßte für einen vollständigen Vergleich der Wirkungen von Skelettmuskel- und Regenwurm-Tropomyosin im Acto-Myosin bzw. Acto-HMM-System die Wirkung von Regenwurm-Tropomyosin auf ein hybrides Acto-HMM-System, welches das HMM des Regenwurm-Myosins enthält, ermittelt werden.

Ein weiterer Ca-unabhängiger Effekt des Regenwurm-Tropomyosins war die Potenzierung der Acto-SF1-ATPase-Aktivität (Abb. 32). Zum besseren Verständnis dieses Versuchsergebnisses wird im folgenden kurz aufgeführt, welche Vorstellungen zur Deutung dieses Phänomens innerhalb des Skelettmuskel-Systems herangezogen werden.

Demnach basiert der Effekt der Potenzierung der Acto-SF1-ATPase-Aktivität bei niedrigen ATP-Konzentrationen (Bremel et al. 1972) a) auf der starken Affinität von nukleotidfreien Myosin-Köpfen zum Actin (- aus welcher der Rigor-Zustand des Muskels resultiert -) und b) auf dem Einfluß des Tropomyosins, durch den jeweils sieben Actin-Monomere zu einer kooperativen Einheit werden. Ein bestimmter Schwellenwert, eine kritische Anzahl von Rigorkomplexen - bedingt durch ATP-Mangel - führt zur Verdrängung des gesamten Tropomyosin-Filaments in die Grube zwischen den Actin-Strängen, was eine Freigabe der verbleibenden, nicht mit Rigorkomplexen blockierten Actin-Monomeren zur Folge hat und einen plötzlichen, sprunghaften Anstieg der Aktivität hervorruft. Dieser vollzieht sich nach dem Alles-oder-Nichts-Gesetz, abhängig von dem oben erwähnten Schwellenwert an Rigorkomplexen. Noch freie Myosin-Köpfe können dann plötzlich - ungehindert durch Tropomyosin - noch verbleibendes ATP spalten. Daher wird dieses Phänomen der Potenzierung auch definiert als kooperativer Effekt von Rigorkomplexen, was soviel bedeutet wie erhöhte Co-Faktor-Aktivität (relativ zur Aktivität mit reinem Actin), welche in Verbindung mit einem hohen Sättigungsgrad an Rigorkomplexen auftritt.

Die potenzierende Wirkung von Regenwurm-Tropomyosin auf die Acto-SF1-ATPase-Aktivität (Abb. 32) zeigt, daß es wie Skelettmuskel-Tropomyosin in der Lage ist - nach dem oben dargestellten Modell - die einzelnen Actin-Monomere zu einer funktionellen Einheit zu verbinden.

Dieser kooperative Effekt ist auch eine Voraussetzung für das Funktionieren von Regenwurm-Tropomyosin im Ca-sensitiven Acto-HMM-System der Skelettmuskulatur. Beide Regenwurm-Tropomyosine lassen sich mit dem Troponin des Skelettmuskels zu einem funktionstüchtigen Tropomyosin-Troponin-Komplex hybridisieren. Dies weist darauf hin, daß trotz deutlicher Abweichungen eine funktionelle Ähnlichkeit zwischen den Tropomyosinen von Regenwurm- und Skelettmuskel besteht, welche bis zur Austauschbarkeit geht.

Für diesen kooperativen Effekt ist die Interaktion von Tropomyosin und Actin von grundlegender Bedeutung. Es wurde, wie in Kap. III. 3.3.1 dargestellt, gezeigt, daß das Tropomyosin des Regenwurms an Actin bindet. Aus den strukturellen Untersuchungen der Parakristalle ging hervor, daß seine Moleküllänge ausreicht, um sieben Actin-Monomere zu überspannen. Nach Untersuchungen des Skelettmuskel-Tropomyosins wurde festgestellt, daß sich die gesamte Aminosäuresequenz dieses doppelsträngigen Moleküls in 14 Regionen (von je 19 2/3 Aminosäureresten) mit ähnlichen physikalischen Eigenschaften einteilen läßt, welche zwei Gruppen von jeweils sieben alternierenden Actin-Bindungsstellen entsprechen. Von diesen wird angenommen, daß sie unterschiedliche Affinität zu den Actin-Monomeren der verschiedenen Actin-Stränge haben (zusf. Darst. Smillie et al., 1980, 1981).

Auf dem Hintergrund der funktionellen Eigenschaften des Regenwurm-Tropomyosins kann angenommen werden, daß beide Tropomyosin-Isoformen eine ähnliche Molekülarchitektur

aufweisen und in vergleichbar differenzierter und hochgeordneter Weise an Actin binden.

Die Frage, warum Tropomyosin in verschiedenen Isoformen auftritt, ist noch nicht geklärt. Beim Skelettmuskel-Tropomyosin bestand zunächst Grund zu der Annahme, daß die αα- und die αβ-Form des Skelettmuskel-Tropomyosins auf schnelle Muskelfasern beschränkt seien, und daß die ββ-Form nur in langsamen Muskelfasern auftrete (Dhoot & Perry, 1979). Doch rezentere Untersuchungen (Bronson & Schachat, 1982) haben gezeigt, daß diese Beziehung zwischen Tropomyosin-Isoformen und Schnelligkeit von Muskelzellen nicht existiert. Doch bleibt die Tatsache bestehen, daß die unterschiedlichen Tropomyosin-Formen nicht gleichmäßig auf die verschiedenen Gewebesorten der Skelettmuskulatur verteilt sind.

Es wurde versucht, die Verteilung der beiden Tropomyosin-Formen des Regenwurms innerhalb des Muskelgewebes dieses Wirbellosen zu ermitteln. Hierbei wurden Gefrierschnitte des Hautmuskelschlauchs mit den entsprechenden Antikörpern (anti-TM_1-IgG und anti-$TM_{2(33)}$-IgG) inkubiert. Anschließende FITC-Markierung der am Schnitt haftenden Antikörper ließ auf eine homogene Verteilung von TM_1 und TM_2 schließen; d.h. sowohl die Ring- als auch die Längsmuskulatur des Wurms waren gleichermaßen fluoreszierend angefärbt. Um festzustellen, ob auf zellulärer Ebene eine unterschiedliche Verteilung der Tropomyosin-Formen vorliegt, wurde mit Triton-behandelten Zellen der Regenwurmmuskulatur entsprechend verfahren. Es trat eine Fluoreszenz der Fibrillen auf, welche in beiden Fällen gleichmäßig über die gesamte Fibrillenlänge und -breite verteilt war. So wäre, falls eine heterogene Verteilung der Tropomyosine der Regenwurmmuskulatur vorläge, diese nur noch auf molekularer Ebene zu suchen.

Diese Frage nach der Verteilung der Tropomyosine auf dem Actin-Filament wirft nochmals das Problem der Zusammengehörigkeit der einzelnen Polypeptidketten, der Monomere, auf. Aus den dargestellten Ergebnissen ging hervor, daß eine Kombination der Untereinheiten mit den Molekulargewichten von 37.000 und 34.000 zu Tropomyosin$_1$ und der Untereinheiten mit den Molekulargewichten von 42.000 und 33.000 zu Tropomyosin$_2$ vorliegt. Falls jedoch trotz der nach den Reinigungseigenschaften offensichtlichen Zusammengehörigkeit der jeweiligen Untereinheiten zu einem funktionstüchtigen Paar eine freie Kombinierbarkeit bestünde, wie sie bei den Untereinheiten des Skelettmuskel-Tropomyosins vorliegt, so wären nicht wie beim letzteren drei, sondern insgesamt zehn verschiedene Kombinationsmöglichkeiten denkbar. Da die Frage nach den tatsächlich vorhandenen Kettenkombinationen sich im Falle des Regenwurm-Tropomyosins nicht durch intramolekulare Disulfidbrückenbildung beantworten ließ, müssen andere Wege gefunden werden, die in der Regenwurmmuskulatur vorhandenen Molekülzusammensetzungen zu ermitteln.

Eines der in Kap. III. 3.3.2 dargestellten Untersuchungsergebnisse könnte in diesem Zusammenhang klärende Hinweise geben. Die beiden Untereinheiten des Tropomyosins$_2$ waren getrennt voneinander nicht in der Lage, die Acto-HMM-ATPase zu hemmen. Die isolierten Ketten des Skelettmuskel-Tropomyosins jedoch haben annähernd gleiche funktionelle Aktivität wie das unfraktionierte Skelettmuskel-Tropomyosin, bestehend aus α- und ß-Tropomyosin-Ketten (Cummins & Perry, 1973). Die isolierten Ketten des Regenwurm-Tropomyosins$_2$ scheinen also nicht in der Lage zu sein, sich zu einem funktionstüchtigen dimeren Tropomyosin-Molekül zu verbinden. Weitere Rekombinationsversuche unter Einbeziehung aller vier isolierten Tropomyosin-Untereinheiten der Regenwurmmuskulatur könnten zur Beantwortung der Frage beitragen, welche Ketten-Kombinationsmöglichkeiten für das Tropomyosin der Regenwurmmuskulatur tatsächlich bestehen.

Nicht nur die eventuelle Formenvielfalt des Regenwurm-Tropomyosins, sondern auch die Menge, in der es im Muskel dieses Wurms auftritt, geben Anlaß zu weiteren Untersuchungen. Nach Schätzung der Gewichtsverhältnisse von Actin und Tropomyosin innerhalb des gesamten Regenwurm-Actomyosins besteht der Verdacht, daß in diesem Muskel weit mehr Tropomyosin vorhanden ist, als zu einer Abdeckung der für Muskelgewebe allgemein geltenden stöchiometrischen Verteilung von sieben Actin-Monomeren zu einem Tropomyosin-Molekül nötig wäre. Es stellt sich also die Frage, ob hier mehr Tropomyosin am Actin vorliegt, als es in anderen Muskeltypen der Fall ist. Eine Möglichkeit wäre auch, einen Teil an Tropomyosin in den Haltestrukturen des Muskels, z. B. den Z-Stäben zu vermuten. Eine Lokalisierung der Tropomyosin-Formen dieses Muskels ist also auch unter diesem Aspekt von Bedeutung.

Nach Beobachtungen während der Präparation der kontraktilen Proteine der Regenwurmmuskulatur ist anzunehmen, daß die beiden Tropomyosin-Formen unterschiedliche Bindungseigenschaften hinsichtlich des Actins, bzw. unterschiedliche Präzipitationseigenschaften haben. In verschiedenen Fraktionen von Ammoniumsulfat-Fällungen war ein ungleiches Mengenverhältnis der beiden Proteine festzustellen. Es wäre weiterhin möglich, daß die beiden Tropomyosin-Isoformen unterschiedliche Funktionen innerhalb der Muskulatur ausüben, obwohl sie nach den dargestellten Ergebnissen offensichtlich gleiche funktionelle Potenz haben.

Durch funktionelle Tests war gezeigt worden, daß im Regenwurmmuskel ein Actin-gekoppeltes Regulationssystem vorliegt (Kap. 2). Es ist anzunehmen, daß durch anwesende regulatorische Proteine die Actin-Filamente derart modifiziert werden, daß nur bei Ca-Anwesenheit eine zyklische Interaktion mit Myosin möglich ist, wohingegen sie bei Ca-Abwesenheit verhindert wird. Vereinfachend ließen sich dementsprechend zwei funktionelle Zustände der Actin-Filamente postulieren, welche sich in Abhängigkeit von der Ca-Konzentration einstellen.

Die Behandlung mit Glutaraldehyd fixierte die Actin-Filamente des Regenwurms in diesen beiden Funktionszuständen. Die durch die jeweilige Ca-Konzentration induzierten Konformationsänderungen waren durch die Vernetzung irreversibel geworden. Dabei war die Fähigkeit des Actins, die HMM-ATPase zu aktivieren, nicht beeinflußt worden. Allein die Fixierung in Abwesenheit von Ca machte diese Aktivierung unmöglich, unabhängig von der nachfolgend herrschenden Ca-Konzentration.

Es können allerdings keine Rückschlüsse auf die Art der Beeinflussung des Actins gezogen werden. Nach der Hypothese der sterischen Hemmung (s. S. 5), welche aufgrund von strukturellen Analysen entstand, wird die Actin-Myosin-Interaktion bei Ca-Abwesenheit durch die Lage des Tropomyosins an den Myosin-Bindungsstellen auf dem Actin-Filament verhindert. Eine Fixierung von Tropomyosin in dieser Lage durch Glutaraldehyd wäre eine sich anbietende Deutung des dargestellten Versuchsergebnisses. Doch biochemische Untersuchungen der letzten Jahre zeigten u. a. die hemmenden und aktivierenden Effekte, die Tropomyosine verschiedener Herkunft auf die Actin-Myosin-Interaktion ausüben können (Eaton et al., 1975; Ditgens et al., 1982; Sobieszek, 1982; Sobieszek & Small, 1977; Lehman & Szent-Györgyi, 1972), welche nicht mit dem Modell

der sterischen Blockade in Einklang stehen. Weiterhin fanden Chalovich und Mitarbeiter (Chalovich et al., 1981; Chalovich & Eisenberg, 1982) bei Untersuchungen innerhalb des Skelettmuskel-Systems, daß die Affinität von Myosin-SF1-ATP und -AF1-ADP-P_i zu reguliertem Actin in An- und Abwesenheit von Ca nahezu gleich ist. Das bedeutet, daß die Bindung von Myosin-Köpfen an Actin nicht durch Tropomyosin-Troponin bei Abwesenheit von Ca verhindert wird. Demzufolge vermuten die Autoren, daß der Komplex regulatorischer Proteine an anderer Stelle in den kinetischen Zyklus der ATP-Hydrolyse eingreift, beispielsweise durch eine Verhinderung der Freigabe des Hydrolyse-Produktes P_i durch den Myosin-ADP-P_i-Komplex.

Auf dem Hintergrund der noch widersprüchlichen Deutungen des Funktionsmechanismus des Tropomyosin-Troponin der Skelettmuskulatur sind keine sicheren Rückschlüsse hinsichtlich des entsprechenden Protein-Komplexes der Regenwurmmuskulatur möglich, doch das Experiment der Fixierung der nativen Actin-Filamente in zwei Funktionszuständen läßt zumindest eine gewisse Übereinstimmung zwischen den Regulationsmechanismen der Actin-Filamente des Skelettmuskels und des Regenwurms vermuten.

Der Komplex regulatorischer Proteine, welcher aus der Regenwurmmuskulatur isoliert worden war, verlieh synthetischem Acto-HMM der Skelettmuskulatur Ca-Senitivität (Abb. 35). Aufgrund dieses Egebnisses wurde er zunächst als Tropomyosin-Troponin (TM-TN) bezeichnet, da es auf zusätzlich zum Tropomyosin vorhandene Troponin-ähnliche Komponenten schließen läßt.

Das bisher am ausführlichsten untersuchte Troponin ist das der Skelettmuskulatur des Kaninchens (zusf. Darst. Potter & Johnson, 1982). Es besteht aus drei Untereinheiten, welche ihrer Funktion entsprechend benannt

wurden. Troponin-C (TnC) bindet Ca, Troponin-I (TnI) bindet inhibitorisch an Actin, und Troponin-T (TnT) bindet an Tropomyosin. Für die einzelnen Komponenten werden folgende Molekulargewichtsbereiche angegeben: TnT: 37.000 - 40.000, TnI: 22.000 - 24.000 und TnC: 17.000 - 18.000 (Ebashi et al., 1972). Zu einem sich über sieben Actin-Monomere erstreckenden Tropomyosin-Molekül gehört jeweils ein Troponin-Komplex. Hieraus ergibt sich ein molares Verhältnis für die Stöchiometrie des regulierten Actin-Filamentes von Actin : Tropomyosin : TnT : TnI : TnC von 7 : 1 : 1 : 1 : 1.

Die maximale Wirkung des TM-TN der Regenwurmmuskulatur, nämlich eine 80 %ige Hemmung der Acto-HMM-ATPase in Abwesenheit von Ca, erfolgte erst beim Einsatz einer relativ großen Menge der Fraktion. Es war etwa dreimal soviel Protein nötig, wie nach dem physiologischen Verhältnis entsprechend der oben aufgeführten Stöchiometrie des regulierten Actin-Filaments ausreichend gewesen wäre. Dies wird auf den hohen Gehalt der Fraktion an Tropomyosin (vgl. Abb. 34 b) zurückgeführt. Die Möglichkeit, daß im Verlauf der Präparation von TM-TN Troponin-ähnliche Komponenten verloren wurden, ist relativ unwahrscheinlich, da nach der Denaturierung des Actins durch Ansäuerung des Extraktes die noch löslichen Proteine in ihrer Gesamtheit durch Ammoniumsulfat gefällt wurden. Eine irreversible Präzipitation von zur Ca-Regulation essentiellen Komponenten bei pH 2,0 ist auszuschließen, da das Pellet, welches beim Abzentrifugieren der unlöslichen Bestandteile erhalten wurde, im wesentlichen nur aus Actin bestand. Unter der Voraussetzung, daß eine Verfälschung des tatsächlich bestehenden Tropomyosin : Troponin-Verhältnisses nicht aufgrund der Präparation erfolgt ist, kann angenommen werden, daß in diesem Muskel nicht das gesamte Tropomyosin mit Troponin besetzt ist. Es wurde bereits festgestellt, daß auch das Verhältnis

Actin : Tropomyosin in der Regenwurmmuskulatur stark zugunsten des Tropomyosins verschoben zu sein scheint. Da man davon ausgehen kann, daß das gesamte Actin-Filament reguliert ist, also mit genügend Troponin-ähnlichen Komponenten versehen, bestätigt sich die schon angedeutete Vermutung, daß nicht unbedingt der gesamte Bestand an Tropomyosin im Regenwurmmuskel die gleiche Funktion hat und eine Rolle innerhalb der Ca-Regulation spielt.

Die SDS-PAGE der TM-TN-Fraktion ließ zwar auf die Anwesenheit Troponin-ähnlicher Komponenten schließen, da Proteine mit niedrigeren Molekulargewichten unter den Banden des Tropomyosins sichtbar waren, doch das Bandenmuster verschiedener TM-TN-Präparationen war nicht immer identisch. Dies zeigt ein Vergleich der Abb. 34 a, 36 c und 36 h. Durch die Herstellung synthetischer regulierter Actin-Filamente konnte durch die Actin-bindenden Eigenschaften von einigen Proteinen und Protein-Fragmenten dieser Fraktion eine Auswahl getroffen werden. Abb. 36 d zeigt, daß in dem Molekulargewichtsbereich des TnI der Skelettmuskulatur die beiden Banden mit den Molekulargewichten von 24.000 und 23.000 deutlich angereichert waren, also an Actin gebunden hatten.

Bei der Desensibilisierung von Regenwurm-Actomyosin werden u.a. Proteine mit den Molekulargewichten von 24.000 und 17.000 entfernt. Dies zeigt ein Vergleich von Abb. 36 f und 36 g. Nach der Resensibilisierung dieses Actomyosins durch die TM-TN-Fraktion der Regenwurmmuskulatur waren diese beiden Proteine in diesem wieder Ca-sensitiven Actomyosin nachzuweisen (Abb. 36 i). Dies mag als eine Bestätigung der Annahme gelten, daß diese Komponenten dem Troponin-Komplex des Regenwurmmuskels zugeordnet werden können.

Ohne daß die leichte Kette des Myosins mit dem Molekulargewicht von 25.000 (LC_{25}) in angereicherter Form nach der Inkubation mit der TM-TN-Fraktion im resensibilisierten

Actomyosin anzutreffen war, hatte erstaunlicherweise auch eine Restaurierung der Myosin-gekoppelten Regulation stattgefunden. Wenn auch das dargestellte Experiment noch keine konkreten Aussagen über eine eventuelle Interaktion zwischen den beiden Regulationssystemen zuläßt, so stellt das desensibilisierte Actomyosin ein System dar, welches geeignet zu sein scheint, auf diese Fragestellung intensiver einzugehen. Weiterhin ist hierzu eine intensivere Untersuchung der Troponin-ähnlichen Komponenten der TM-TN-Fraktion erforderlich.

Zur Isolierung dieser Troponin-Anteile wurde versucht, das Tropomyosin der TM-TN-Fraktion durch isoelektrische Präzipitation zu fällen. Doch die im Überstand verbleibenden Proteine zeigten noch die Eigenschaft des gesamten TM-TN-Komplexes, d.h. in funktionellen Tests waren sie in der Lage, synthetischem Kaninchen-Acto-HMM Ca-Sensitivität zu verleihen. Daraus konnte geschlossen werden, daß in der Fraktion noch Tropomyosin-Verunreinigungen vorlagen (Ditgens, 1979). Die Präparation der Troponin-ähnlichen Proteine ausgehend vom gesamten Actomyosin (vgl. Schema S. 58) hatte sich in dieser Hinsicht als vorteilhaft erwiesen. Die resultierende Troponin-Fraktion hatte nur in Verbindung mit zusätzlich beigefügtem Tropomyosin Ca-regulatorische Potenz, konnte also selbst als Tropomyosin-frei angesehen werden. Die Präparation von Troponin der Skelett- und Herzmuskulatur von Wirbeltieren erfolgt meist ausgehend von einer TM-TN-Fraktion. Da dies bei der Isolierung von Regenwurm-Troponin nicht möglich war, ist zu vermuten, daß der Zusammenhalt von Tropomyosin und Troponin innerhalb der TM-TN-Fraktion intensiver ist als in den entsprechenden Fraktionen der Wirbeltiermuskulatur. Die Präparation des Regenwurm-Troponins nach der in Kap. II. 2.1 dargestellten Methode hatte den Nachteil, daß die Fraktion eine Vielzahl von nicht bekannten Protein-Komponenten enthielt,

welche bei einem Vergleich der SDS-PAGE der TM-TN-Fraktion und dieser Troponin-Fraktion nicht als zum Komplex regulatorischer Proteine gehörend angesehen werden konnten. Die starken Verunreinigungen der Fraktion sind vom Präparationsverfahren her leicht erklärlich, denn in ihr waren alle Proteine des Regenwurm-Actomyosins enthalten, welche bei pH 4,6 noch löslich waren. Eine Fraktionierung des nach der isoelektrischen Präzipitation bei pH 4,6 erhaltenen Überstandes mit unterschiedlichen Ammoniumsulfat-Sättigungen hatte sich nicht bewährt. Viele der Protein-Banden in der Troponin-Fraktion wurden als proteolytische Spaltprodukte angesehen, da sie in der SDS-PAGE des gesamten Actomyosins nicht anzutreffen waren. Es wurde versucht, durch Behandlung bei pH 2,0 nach der Methode von Hartshorne & Dreizen (1972) die proteolytischen Aktivitäten in dieser Fraktion zu mindern, was jedoch zu keinem sichtbaren Erfolg führte. Nach dem in Abb. 37 dargestellten Ergebnis, Rekombination eines funktionstüchtigen TM-TN-Komplexes aus der rohen Troponin-Fraktion und Regenwurm-Tropomyosin kann jedoch geschlossen werden, daß in dieser rohen Troponin-Fraktion die Komponenten enthalten waren, welche zum Troponin-Komplex des Regenwurmmuskels gehören.

Aufgrund der Unsauberkeit der Fraktion konnten keine Informationen gewonnen werden, aus welchen Proteinen das Troponin des Regenwurms besteht, und es wurden Versuche zur Trennung seiner Bestandteile unternommen. Dies schien auch insofern als unbedingt erforderlich, da ohne eine Isolierung und funktionelle Charakterisierung der einzelnen Komponenten keine Aussagen über ihre Wirkungsweise möglich sind. Zur Gewinnung erster Anhaltspunkte bietet sich eine Orientierung am Troponin der Skelettmuskulatur an, über dessen Wirkungsweise schon genauere Vorstellungen herrschen.

Nach der heutigen Auffassung (zusf. Darst. Potter & Johnson, 1982), werden durch die Bindung von Ca an das TnC der Skelettmuskulatur strukturelle Änderungen innerhalb des gesamten Troponin-Komplexes hervorgerufen. Diese sind begleitet von einem Wandel der Bindungsaffinitäten der Komponenten untereinander sowie hinsichtlich ihrer Affinität zu Tropomyosin und Actin, was letztlich in der Bereitschaft - bzw. bei Ca-Abwesenheit in der Unfähigkeit - des Actins mit Myosin zyklisch zu interagieren resultiert (Abb. 39).

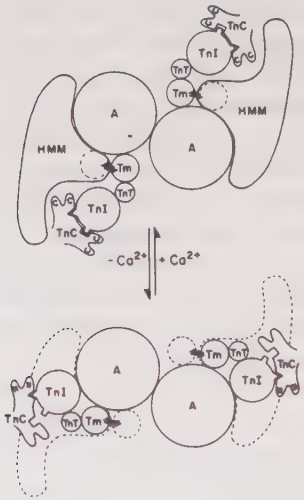


Abb. 39: Modell für die Regulation der Actin-Myosin-Interaktion durch Troponin, Tropomyosin und Ca. Schematisch sind Querschnitte durch ein reguliertes Actin-Filament im Bereich des Troponin dargestellt. Der obere Teil der Abbildung zeigt den (aktivierten) Zustand in Anwesenheit von Ca, wobei Tropomyosin die Bindung von HMM an Actin nicht behindert. Der untere Teil verdeutlicht den (inaktiven) Zustand, bei welchem die spezifischen Ca-Bindungsstellen des TnC frei und die unspezifischen durch Mg besetzt sind; dabei liegt Tropomyosin in der Sperr-Position. A, Actin; Tm, Tropomyosin; TnC, TnI und TnT, entsprechende Komponenten des Troponin (aus Potter & Johnson, 1982).

Im Gegensatz zu der früheren Vorstellung, daß die Anordnung der Troponin-Komponenten ausgehend von Tropomyosin in der Reihenfolge TnT-TnC-TnI sei, nimmt man neuerdings keine direkte Verbindung mehr zwischen TnT und TnI an und postuliert die Abfolge TnT-TnI-TnC. Hierbei bestehen Ca-unabhängige Interaktionen von TnT mit Tropomyosin und TnI sowie Ca-abhängige von TnC mit TnI. Die Bindung des TnI-TnC-Komplexes über TnI an Actin wird bei Anwesenheit von Ca, bei Absättigung der vier Ca-Bindungsstellen des TnC, stark geschwächt, so daß TnI nur noch über TnT und Tropomyosin mit dem Actin-Filament Kontakt hat. Bei Abwesenheit von Ca wird die Bindung zwischen TnC und TnI geschwächt, wohingegen die Affinität von TnI zum Actin steigt. Gleichzeitig mit der stärkeren Bindung von TnI an Actin wird das über TnT mit TnI in Verbindung stehende Tropomyosin fest am Actin verankert, und zwar in einer peripheren Position, welche auch nach rezenteren Untersuchungen (Taylor & Amos, 1981) den Myosin-Bindungsstellen entspricht.

Die SDS-PAGE der durch die Auftrennung des Regenwurm-Troponins erhaltenen Fraktionen zeigte, daß Proteinbanden in den Molekulargewichtsbereichen vorlagen, welche für TnI und TnC der Wirbeltiermuskulatur bekannt sind. In der TnC-Fraktion (Abb. 34 d) befindet sich nur ein stark angereichertes Protein mit einem Molekulargewicht von 17.000. Die TnI-Fraktion weist neben einem Protein mit dem Molekulargewicht von 24.000 noch weitere Banden im Molekulargewichtsbereich um 40.000 auf (Abb. 34 c).

Die Identifizierung dieser beiden Proteinfraktionen als TnI und TnC erfolgte durch funktionelle Tests nach Kriterien, welche für die entsprechenden Troponin-Komponenten der Wirbeltiermuskulatur gelten. Die das Regenwurm-TnI enthaltende Fraktion hemmte die Acto-HMM-ATPase. Diese Hemmung

wurde durch Tropomyosin verstärkt. Beide Effekte sind als charakteristisch für TnI bekannt (Perry et al., 1972). Die Aufhebung der durch TnI verursachten Hemmung durch eine Komponente des Regenwurm-Troponins charakterisierte dieses Protein als TnC-ähnlich. Aufgrund der hemmenden Wirkung, die TnI allein auf die Acto-HMM-ATPase ausübte, kann angenommen werden, daß es an Actin bindet, wie es auch für das TnI des Skelettmuskels bekannt ist. Welche Bindungsverhältnisse bei der Verstärkung der Hemmung durch Tropomyosin für das Regenwurm-TnI herrschen, ist nach dem dargestellten Versuchsergebnis nicht direkt zu beurteilen. Doch aufgrund des gleichen Verhaltens der beiden TnI's verschiedener Herkunft ist zu vermuten, daß auch das TnI des Regenwurms wie das des Skelettmuskels nicht an Tropomyosin bindet. Für das TnI und das Tropomyosin des Skelettmuskels wurde bisher keine direkte Interaktion nachgewiesen (Potter & Gergely, 1974; Greaser et al., 1972). Für diese Proteine wurde gezeigt, daß sie beide direkt an Actin binden und die Verstärkung der TnI-Hemmung durch Tropomyosin wird zurückgeführt auf den kooperativen Effekt, den letzteres auf die Actin-Monomere ausübt (Eaton et al., 1975). Durch Tropomyosin werden auch nicht mit TnI besetzte Actin-Moleküle so beeinflußt, daß sie nicht mehr zyklisch mit Myosin interagieren können.

Die in der SDS-PAGE der Fraktion des Regenwurm-TnI sichtbaren Banden um den Molekulargewichtsbereich von 40.000 (Abb. 34 c) wurden als Verunreinigungen gedeutet, und es ergaben sich bisher keine Hinweise zu ihrer Identifizierung. Es ist auszuschließen, daß es sich hierbei um Tropomyosin handelt. Aus Tabelle 4 a geht hervor, daß eine Menge von 0,28 mg dieser Fraktion pro mg Actin eine nur 6 %ige Hemmung der ATPase-Aktivität bewirkte. Die Menge der Verunreinigungen in der Fraktion wird auf mehr als 50 % geschätzt. Falls diese Tropomyosin wären, träte eine

viel stärkere Hemmung von etwa 20 - 30 % auf (vgl. Abb. 28 und 31). Es wurde zwar gezeigt, daß die Untereinheiten von Tropomyosin$_2$ getrennt voneinander keine hemmende Wirkung ausüben, doch unter den Bedingungen, unter denen die TnI-Fraktion gewonnen wurde, erfolgte keine Auftrennung von Tropomyosin in seine Untereinheiten.

Eine dem TnT des Skelettmuskels entsprechende Proteinkomponente wurde bisher nicht für die Regenwurmmuskulatur nachgewiesen. Für das Actomyosin-System des Skelettmuskels konnte eine Ca-abhängige Hemmung der ATPase auch ohne die Anwesenheit von TnT nachgewiesen werden (Perry et al., 1972). Doch dieser Effekt stellte sich nur beim Einsatz von unphysiologisch großen Mengen an TnI und TnC ein (Ebashi, 1972). TnT ist also zur Ca-Regulation bei den in diesem Muskel herrschenden molaren Verhältnissen unentbehrlich.

Die TnI- und TnC-Komponenten des Regenwurms scheinen nicht in auffälliger Weise im Muskel dieses Evertebraten vorhanden zu sein. Dies zeigt zumindest die SDS-PAGE von sowohl Actomyosin als auch der Thin-filament- oder der TM-TN-Fraktion. Demnach wäre die Existenz eines TnT-ähnlichen Proteins im Regenwurmmuskel zu erwarten. Hinsichtlich des Molekulargewichtes könnte eine der drei als Verunreinigungen der TnI-Fraktionen angesehenen Banden TnT darstellen. Dagegen spricht allerdings, daß TnT der Skelettmuskulatur ebenso wie Tropomyosin in der Lage ist, die TnI-Hemmung in ähnlichem Maße wie Tropomyosin zu verstärken (Eisenberg & Kielley, 1974). Die Hemmung der TnI enthaltenden Fraktion war jedoch relativ gering (Tabelle 4 a) und wurde erst durch Zugabe von Tropomyosin verstärkt.

Die Frage nach der Existenz eines TnT-ähnlichen Proteins besteht auch bei anderen Evertebratenmuskeln. Nach der Untersuchung von Thin-filament-Fraktionen verschiedenen Ursprungs durch die SDS-PAGE kommt Lehman (1976) zu dem

allgemeinen Schluß, daß die Muskeln Wirbelloser keine TnT-ähnliche Komponente mit einem Molekulargewicht zwischen 37.000 und 42.000 enthalten. Nach den Erfahrungen, welche im Rahmen der eigenen Untersuchungen mit Proteinen ähnlichen Molekulargewichts gemacht wurden, welche nur durch die zwei-dimensionale Elektrophorese aufgetrennt werden konnten, scheint die Annahme Lehmans (1976) nicht unbedingt vertretbar. In mehreren Thin-filament-Fraktionen fand Lehman (1976) Banden im Molekulargewichtsbereich zwischen 55.000 und 60.000, welche er als "Kandidaten für TnT" bezeichnete. Kürzlich gelang es für den *Limulus*-Muskel ein TnT-ähnliches Protein mit dem Molekulargewicht von 59.000 durch immunologische Methoden auf den Myofibrillen dieses Arthropoden zu lokalisieren (Lehman, 1982). Doch es konnte noch nicht in genügender Menge und Reinheit für funktionelle Tests isoliert werden.

Es ist bisher zwar noch nicht gelungen, ein funktionstüchtiges Troponin eines Evertebratenmuskels aus den reinen Präparationen seiner drei Untereinheiten zu rekombinieren, doch lassen die Untersuchungen an Muskeln verschiedener Wirbelloser darauf schließen, daß dem Troponin des Wirbeltiermuskels entsprechende Komponenten in diesen Muskeln wirksam sind. Für den Hummer (*Homarus americanus*) ist die Existenz von TnI und TnC nachgewiesen (Lehman & Szent-Györgyi, 1975). Die Proteine haben Molekulargewichte von 29.000 und 18.000 und zeigen die für diese Proteine charakteristischen Aktivitäten. Nachdem aus der dual regulierten Muskulatur des Tintenfisches *Ommastrephes sloani pacificus* eine funktionstüchtige Troponin-Fraktion, bestehend aus Komponenten mit den Molekulargewichten von 52.000, 28.000 und 24.000, isoliert werden konnte (Konno, 1978), gelang es kürzlich auch, aus dem Mantelmuskel des *Loligo pealei* ein TnC-ähnliches Protein zu gewinnen (Tsuchiya et al., 1982). Die bei der Untersuchung des Troponin-Komplexes der Regenwurmmuskula-

tur gewonnene Erkenntnis, daß auffallende Parallelen zum Skelettmuskel-Troponin vorhanden sind, ist also für Actin- oder dual regulierte Muskeln nicht ungewöhnlich. Das TM-TN-System der Actin-gekoppelten Regulation kann daraufhin als relativ konservativ im Tierreich verbreitet angesehen werden. Doch ist zu bedenken, daß sowohl bei den oben erwähnten Untersuchungen als auch bei den eigenen Arbeiten an der Regenwurmmuskulatur eine Orientierung an den Daten, welche für das Troponin der Skelettmuskulatur gelten, erfolgte. Dies bedeutet, daß bei diesem Verfahren nach Übereinstimmung mit diesem gut bekannten System gesucht wurde, um überhaupt eine Klassifizierung der isolierten Wirbellosen-Proteine vornehmen zu können. Daher war es lediglich möglich, Proteine zu charakterisieren, welche in ähnlicher Weise auch im Skelettmuskel-System wirksam sind. Doch ist es nicht ausgeschlossen, daß in der Troponin-Fraktion der Regenwurmmuskulatur weitere Proteine enthalten sind, welche für die Ca-Regulation dieses Muskels von Bedeutung sind, die jedoch nur charakteristisch für dual regulierte Actomyosin-Systeme sind.

Die hier im letzten Kapitel dargestellten Ergebnisse können als der Anfang einer Art von Bestandsaufnahme der in diesem dual regulierten Muskel vorhandenen Actin-gekoppelten regulatorischen Proteine angesehen werden und eine Grundlage für weitere Untersuchungen bilden, welche sich vornehmlich mit dem Problem von eventuell vorhandenen zwischen den Regulationssystemen stehenden Proteinen beschäftigen. Interessant wäre z. B. die Frage, ob und inwieweit im dual regulierten System die Ca-bindende Troponin-Untereinheit durch ein offenbar ebenfalls im Cytoplasma der Muskelzellen vorhandenes lösliches Ca-bindendes Protein (D'Haese & Gerday, unveröff.), sowie Calmodulin (Waisman et al., 1978) beeinflußt wird. Weiter wäre denkbar, daß neben dem Troponin-System noch

andere unbekannte Faktoren wirksam sind, welche Ca-abhängige Einflüsse auf die Actin-Myosin-Interaktion und die Myosin-gekoppelte Regulation haben. Ein experimenteller Zugang hierzu könnte über eine Blockierung der Troponin-Funktion durch Antikörper gegen eine der Komponenten des Komplexes erreicht werden.

Durch immunologische Methoden kann auch die Fragestellung, ob im Regenwurmmuskel Troponin-Isoformen existieren, bearbeitet werden. An Gewebsschnitten der Kaninchen-Skelettmuskulatur wurden Troponin-Isoformen in jeweils schnellen und langsamen Muskelfasern durch den indirekten Immuno-Peroxidase-Nachweis lokalisiert (Dhoot & Perry, 1979). Durch zwei-dimensionale Elektrophorese von einzelnen schnellen und langsamen Fasern der Skelettmuskulatur des Huhns wurde gezeigt, daß die Isoformen der Troponin-Untereinheiten als 'Homokomplex', d. h. immer in der gleichen Kombination in den entsprechenden Zelltypen vorkommen (Mikawa et al., 1981). Diesen Untersuchungen zufolge sind also die Isoformen der Wirbeltier-Skelettmuskulatur gewebsspezifisch bezogen auf die Schnelligkeit des Fasertyps, wie es bei den Tropomyosin-Isoformen der Skelettmuskulatur nicht der Fall ist.

Es wurde bereits dargestellt, daß in der Regenwurmmuskulatur zwei Isoformen von Tropomyosin existieren. Es wurde versucht, mit Hilfe immunologischer Methoden zu ermitteln, ob zu den beiden Tropomyosin-Formen jeweils unterschiedliche Troponin-Formen gehören. Die an Cyanbromid-aktivierte Sepharose gekoppelten Antikörper gegen die Tropomyosin-Isoformen, bzw. ihre Untereinheiten, waren in der Lage, die entsprechenden Antigene zu binden. Eine rohe TM-TN-Fraktion wurde mit den immobilisierten Antikörpern in Kontakt gebracht, und es konnte gezeigt werden, daß zusammen mit den Tropomyosinen Proteine, welche als Troponin-Untereinheiten angesehen werden können, an die Säule gebunden hatten. Es kann jedoch zur Zeit noch nicht entschieden werden, ob es sich hierbei um unterschiedliche Troponin-Formen handelt.

V. Zusammenfassung

1. Aus der schrägestreiften Muskulatur des Regenwurms *Lumbricus terrestris* wurden Einzelzellen isoliert, welche in Abhängigkeit von der Anwesenheit von Ca-Ionen bei ATP-Zugabe auf etwa 25 % ihrer Ausgangslänge kontrahierten.

   Durch Glycerinierung wurden - wie vergleichende elektronenmikroskopische Untersuchungen zeigten - die stabförmigen Z-Elemente dieses Muskels aufgelöst. Die Kontraktion der durch die Glycerin-Behandlung voneinander getrennten Fibrillen bei ATP-Zugabe bewirkte eine Verkürzung der gesamten Zelle. Daher kann angenommen werden, daß in diesem Muskeltyp nicht die Verkürzung einzelner Sarkomere der vorherrschende Prozess bei der Kontraktion ist, sondern die die Fibrillen-Verkürzung bewirkende Verschiebung von Myosin-Filamenten gegeneinander.

2. Die ATPase-Aktivität des isolierten Actomyosins der Regenwurmmuskulatur ist abhängig von der Ca-Konzentration. Diese Ca-Sensitivität wird durch regulatorische Proteine sowohl am Myosin als auch am Actin bewirkt. Dies wurde u.a. durch Hybridisierung von nativem Myosin und Actin mit den entsprechenden nicht Ca-sensitiven Komponenten gezeigt. Hieraus ging hervor, daß beide Regulationssysteme dieses dual regulierten Muskels mit gleicher Effektivität die Actomyosin-ATPase bei Ca-Entzug hemmen.

   Sowohl der Grad der Ca-Sensitivität als auch der Bereich der Ca-Konzentration, welcher für die Regulation der ATPase-Aktivität ausschlaggebend ist, ist abhängig von der KCl-Konzentration. Unterschiedliche Myosin-Präparationen sind in dieser Abhängigkeit variabel. Unfraktioniertes Gesamt-Actomyosin verhält sich anders als hybridisierte oder synthetische Actomyosin-Systeme.

3. Aus der Regenwurmmuskulatur wurde Tropomyosin isoliert, welches durch Ionenaustauscher-Chromatographie fraktioniert wurde. Es wurden zwei dimere TM-Formen isoliert, welche ins-

gesamt aus vier verschiedenen Untereinheiten bestehen. Die beiden monomeren Polypeptidketten der einzelnen TM-Formen konnten in Anwesenheit von Harnstoff präparativ getrennt werden.

Beide als TM-Isoformen angesehenen Proteine wurden im Vergleich mit dem TM der quergestreiften Skelettmuskulatur charakterisiert und zeigen beide die folgenden Eigenschaften. a) sie aggregieren in Form von geordneten Parakristallen mit einer 4o nm-Periodizität; b) sie binden an F-Actin des Skelettmuskels; c) sie hemmen die Acto-HMM-ATPase in stärkerem Ausmaß als das TM des Skelettmuskels; d) sie können TM im Ca-sensitiven Acto-HMM-System des Skelettmuskels ersetzen, d.h. sie bilden mit TN einen hybriden, funktionstüchtigen TM-TN-Komplex.

Die Untereinheiten von TM_2 zeigen nur in Kombination miteinander einen Hemmungseffekt auf die Acto-HMM-ATPase-Aktivität, isoliert voneinander haben sie nahezu keinen Einfluß. Es kann angenommen werden, daß sie nicht wie die Untereinheiten des Skelettmuskel-TMs in der Lage sind, Homodimere zu bilden.

4. Aus der Fraktion nativer Actin-Filamente der Regenwurmmuskulatur wurde ein dem TM-TN des Skelettmuskels entsprechender Proteinkomlex isoliert, welcher in der Lage ist, desensibilisiertem Acto-HMM des Skelettmuskels und desensibilisiertem Actomyosin des Regenwurms Ca-Sensitivität zu verleihen.

   Eine rohe TN-Fraktion der Regenwurmmuskulatur konnte mit TM dieses Muskels zu einem funktionstüchtigen TM-TN-Komplex rekombiniert werden.

   Durch säulenchromatographische Fraktionierung des rohen TN wurde ein TnI- und ein TnC-ähnliches Protein gewonnen. Diese Proteine wurden durch funktionelle Tests identifiziert. TnI hemmte die Acto-HMM-ATPase-Aktivität. Diese Hemmung wurde durch TM verstärkt und durch TnC neutralisiert.

VI. Verzeichnis der Abkürzungen

AS	Ammoniumsulfat
APS	Ammoniumpersulfat
ATP	Adenosintriphosphat
DTNB	5,5'-Dithio-bis(2-nitrobenzoat)
DTT	Dithiothreitol
EDTA	Ethylendinitrilotetraessigsäure
EGTA	Ethylenglycol-bis-(2-aminoethylether)-N,N-tetraessigsäure
F-Actin	filamentöses Actin - im Gegensatz zu G-Actin, globuläres Actin
FITC	Fluoresceinisothiocyanat
HEPES	N-2-Hydroxyethylpiperazin-N'-ethansulfonsäure
HMM	Heavy Meromyosin, Spaltprodukt des Myosins
IEF	Isoelektrische Fokussierung
IgG	Immunglobulin G
LC	Light Chain, leichte Kette des Myosins
MG	Molekulargewicht
PAGE	Polyacrylamid-Gelelektrophorese
P_i	anorganisches Phosphat
PMSF	Phenylmethylsulfonylfluorid
PVC	Polyvinylchlorid
SDS	Dodecylsulfat-Natriumsalz
SF1	Subfragment-1, Spaltprodukt des Myosins
SR	Sarkoplasmatisches Retikulum
TCA	Trichloressigsäure
TEMED	N,N,N,N-Tetramethylethylendiamin
TM	Tropomyosin
TM-TN	Tropomyosin-Troponin
TN	Troponin
TnC	Troponin-C
TnI	Troponin-I
TnT	Troponin-T
Tris	Tris-(hydroxymethyl)-aminomethan

VII. Literaturverzeichnis

Bagby, R.M., Young, A.M., Dotson, R.S., Fisher, B.A. & Mc Kinnon, K. (1971) Contraction of single smooth muscle cells from *Bufomarinus* stomach. Nature 234, 351-352.

Bailey, K. (1948) Tropomyosin: a new asymmetric protein component of the muscle fibril. Biochem. J. 43, 271-273.

Bouligand, Y. (1966) La disposition des myofilaments chez une annélide polychète. J. Microscopie 5, 305-322.

Bozler, E. (1954) Relaxation in extracted muscle fibers. J. Gen. Physiol. 38, 149-159.

Bradford, M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding. Anal. Biochem. 72, 248

Bremel, R.D., Murray, J.M. & Weber, A. (1972) Manifestations of cooperative behaviour in the regulated actin filament during actin-activated ATP hydrolysis in the presence of calcium. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 267-275.

Bronson, D.D. & Schachat, F.H. (1982) Heterogeneity of contractile proteins. J. Biol. Chem. 257, 3937-3944.

Carraro, U., Catani, C., Dalla Libera, L., Vascon, M. & Zanelle, G. (1981) Differential distribution of tropomyosin subunits in fast and slow rat muscles and ist change in long-term denervated hemidiaphragm. FEBS Lett. 128, 233-236.

Caspar, D.L.D., Cohen, C. & Longley, W. (1969) Tropomyosin: crystal structure, polymorphism and molecular interactions. J. Mol. Biol. 41, 87-107.

Chacko, S., Conti, M.A. & Adelstein, R.S. (1977) Effect of phosphorylation of smooth muscle myosin on actin activation and Ca-regulation. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 74, 129-133.

Chalovich, J.M., Chock, P.B. & Eisenberg, E. (1981) Mechanism of action of troponin-tropomyosin. Inhibition of actomyosin ATPase activity without inhibition of myosin binding to actin. J. Biol. Chem. 256, 575-578.

Chalovich, J.M. & Eisenberg, E. (1982) Inhibition of actomyosin ATPase activity by tropomyosin-troponin without blocking the binding of myosin to actin. J. Biol. Chem. 257, 2432-2437.

Chua, N. (1980) Electrophoretic analysis of chloroplast proteins. Methods in Enzymology 69, 434-446.

Cleaveland, D.W., Fischer, S.G., Kirschner, M. W. & Laemmli, U.K. (1977) Peptide mapping by limited proteolysis in sodium dodecyl sulfate and analysis by gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 252, 1102-1106.

Cohen, C. & Longley, W. (1966) Tropomyosin paracrystals formed by divalent cations. Science 152, 794-796.

Cohen, I. (1982) Cytoplasmic tropomyosins. Methods in Enzymology 85, 373-375.

Cohen, I. & Cohen, C. (1972) A tropomyosin-like protein from human platelets. J. Mol. Biol. 68, 383-387.

Crimmins, D.L., Isom, L.L. & Holtzer, A. (1981) On the preparation and properties of earthworm tropomyosin. Comp. Biochem. Physiol. 69B, 35-46.

Cummins, P. & Perry, S.V. (1973) The subunits and biological activity of polymorphic forms of tropomyosin. Biochem. J. 433, 765-777.

Cummins, P. & Perry, S.V. (1974) Chemical and immunochemical characteristics of tropomyosins from striated and smooth muscle. Biochem. J. 141, 43-49.

Dabrowska, R., Nowak, E. & Drabikowski, W. (1980) Comparative studies of chicken gizzard and rabbit skeletal tropomyosin. Comp.Biochem. Physiol. 65, 75-83.

Dhoot, G.K. & Perry, S.V. (1979) Distribution of polymorphic forms of troponin components and tropomyosin in skeletal muscle. Nature 278, 714-718.

Ditgens, A. (1979) Regulation der Kontraktion schräggestreifter Muskulatur bei *Lumbricus terrestris* L. Diplomarbeit der Mathem.-Naturwiss. Fak. d. Univ. Düsseldorf.

Ditgens, A., D'Haese, J., Small, J.V. & Sobieszek, A. (1982) Properties of tropomyosin from the dual regulated obliquely striated body wall muscle of the earthworm (*Lumbricus terrestris* L.). J. Muscle Res. Cell. Mot. 3, 57-74.

D'Haese, J. (1980) Regulatory light chains of myosin from the obliquely striated body wall muscle of *Lumbricus terrestris*. FEBS Lett. 121, 243-244.

Eaton, B.L., Kominz, D.L. & Eisenberg, E. (1975) Correlation between the inhibition of the acto-heavy meromyosin ATPase and the binding of tropomyosin to F-actin: effects of Mg, KCl, troponin I, and troponin C. Biochemistry 14, 2718-2725.

Ebashi, S. (1972) Separation of troponin into its three components. J. Biochem. 72, 787-790.

Ebashi, S. & Ebashi, F. (1964) A new component participating in the superpreciptation of myosin B. J. Biochem. 55, 6o4-613.

Ebashi, S. & Endo, M. (1968) Calcium ion and muscle contraction. Progr. Biophys. Mol. Biol. 18, 123-183.

Ebashi, S., Ohtsuki, I. & Mihashi, K. (1972) Regulatory proteins of muscle with special reference to troponin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 311-318.

Ebashi, S., Wakabayashi, T. & Ebashi, F. (1971) Troponin and its components. J. Biochem. 69, 441-445.

Eckel, J. & Reinauer, H. (1980) Characteristics of insulin receptors in the heart muscle. Binding of insulin to isolated muscle cells from adult rat heart. Biochim. Biophys. Acta 629, 510-521.

Eisenberg, E. & Kielley, W.W. (1974) Troponin-tropomyosin-complex. J. Biol. Chem. 249, 4742-4748.

Eisenberg, E. & Moos, C. (1967) The interaction of actin with myosin and heavy meromyosin solution at low ionic strength. J. Biol. Chem. 242, 2945-2951.

Eisenberg, E. & Moos, C. (1970) Actin activation of heavy meromyosin Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 245, 2451-2456.

Elliott, G.F., Lowy, J. & Worthington, C.R. (1963) An x-ray and light-diffraction study of the filament lattice of striated muscle in the living state and in rigor. J. Mol. Biol. 6, 295-305.

Ellman, G.L. (1959) Tissue sulfhydryl groups. Arch. Biochem. Biophys. 82, 70-77.

Engelmann, T.W. (1881) Ueber den faserigen Bau der contractilen Substanzen, mit besonderer Berücksichtigung der glatten und doppelt schräggestreiften Muskelfasern. Pflüger's Arch. Ges. Physiol. 25, 538-565.

Fay, F.S. & Delise, C.M. (1973) Contraction of isolated smooth muscle cells - structural changes. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 70, 641-645.

Fenner, C., Traut, R.R., Mason, D.T. & William-Coffelt, J. (1975) Quantification of Coomassie Blue stained proteins in polyacrylamide gels based on analysis of elected dye. Anal. Biochem. 63, 595-602.

Fine, R.E. & Blitz, A.L. (1975) A chemical comparison of tropomyosins from muscle and non-muscle tissues. J. Mol. Biol. 95, 447-454.

Fiske, C.H. & Subbarow, Y. (1925) The colorimetric determination of phosphorus. J. Biol. Chem. 66, 375-400.

Greaser, M.L. & Gergely, J. (1971) Reconstitution of troponin activity from the three protein components. J. Biol. Chem. 246, 4226-4233.

Greaser, M.L. & Gergely, J. (1973) Purification and properties of the components from troponin. J. Biol. Chem. 248, 2125-2133.

Greaser, M.L., Yamaguchi, M., Brecke, C., Potter, J. & Gergely, J. (1972) Troponin subunits and their interactions. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 235-244.

Görg, A., Postel, W. & Westermeier, R. (1978) Ultrathin-layer isoelectric focusing in polyacrylamide gels on cellophane. Anal. Biochem. 89, 60-70.

Hanson, J. (1957) The structure of the smooth muscle fibres in the body wall of the earthworm. J. Biophys. Biochem. Cytol. 3, 111-121.

Hanson, J. & Lowy, J. (1957) Structure of smooth muscles. Nature 180, 906-908.

Harris, H.E., Tso, M.-Y. & Epstein, H.F. (1977) Actin- and myosin linked calcium regulation in the nematode *Caenorhabditis elegans*. Biochemical and structural properties of native filaments and purified proteins. Biochemistry 16, 859-865.

Hartshorne, D.J. & Dreizen, P. (1972) Studies on the subunit composition of troponin. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 225-234.

Hartshorne, D.J. & Mueller, H. (1968) Fractionation of troponin into two distinct proteins. Biochem. Biophys. Res. Commun. 31, 647-653.

Hartshorne, D.J. & Mueller, H. (1969) The preparation of tropomyosin and troponin from natural actomyosin. Biochim. Biophys. Acta 175, 301-319.

Hartshorne, D.J., Gorecka, A. & Aksoy, M.O. (1977) Aspects of the regulatory mechanism in smooth muscle. In: Excitation-Contraction Coupling in Smooth Muscle, Hrsg. R. Casteels, T. Godfraind und J.C. Rüegg. Amsterdam: Elsevier, 377-384.

Hartshorne, D.J., Perry, S.V. & Davies, V. (1966) A factor inhibiting Adenosine Triphosphatase activity and the superprecipitation of actomyosin. Nature 209, 1352-1353.

Hartshorne, D.J. & Siemankowski, R.F. (1981) Regulation of smooth muscle actomyosin. Ann. Rev. Physiol. 43, 519-530.

Haselgrove, J.C. (1972) X-ray evidence for a conformational change in the actin-containing filaments of vertebrate striated muscle. Cold Spring Harbor Symp. Quant Biol. 37, 341-352.

Heumann, H.-G. & Zebe, E. (1967) Über Feinbau und Funktionsweise der Fasern aus dem Hautmuskelschlauch des Regenwurms, *Lumbricus terrestris* L. Z. Zellforsch. 78, 131-150.

Huxley, A.F. & Niedergerke, R. (1954) Structural changes in muscle during contraction. Nature 173, 971-976.

Huxley, H.E. (1963) Electron microscope studies on the structure of natural and synthetic protein filaments from striated muscle. J. Mol. Biol. 7, 281-308.

Huxley, H.E. (1972) Molecular basis of contraction in cross-striated muscles. In: The Structure and Functions of Muscle, Hrsg. G.H. Bourne, 2nd edn., Academic Press, New York, Vol. 1, 301-387.

Huxley, H.E. (1972) Structural changes in the actin-containing filaments during contraction. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 361-376.

Johnson, P. & Smillie, L.B. (1975) Rabbit skeletal α-tropomyosin chains are in register. Biochem. Biophys. Res. Commun. 64, 1316-1322.

Kawaguti, S. & Ikemoto, N. (1959) Electron microscopic patterns of earthworm muscle in relaxation and contraction induced by glycerol and Adenosine Triphosphate. Biol. J. Okayama Univ. 5, 57-72.

Kendrick-Jones, J., Szentkiralyi, E.M. & Szent-Györgyi, A.G. (1976) Regulatory light chains in myosins. J. Mol. Biol. 104, 747-775.

Knapp, M.F. & Mill, P.J. (1971) The contractile mechanism in obliquely striated body wall muscle of the earthworm, *Lumbricus terrestris*. J. Cell Sci. 8, 413-425.

Kominz, D.R. & Gröschel-Stewart, U. (1973) Antibody-dependent size changes of myofibrils and isolated smooth muscle cells. J. Mechanochem. Cell Motil. 2, 181-191.

Konno, K. (1978) Two calcium regulation systems in squid (*Ommastrephes sloani pacificus*) muscle. J. Biochem. 84, 1431-1440.

Laemmli, U.K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4. Nature 227, 680-685.

Lanzavecchia, G. (1977) Morphological modulations in helical muscles (Aschelminthes and Annelida). Int. Rev. Cytol. 51, 133-181.

Lehman, W. (1976) Phylogenetic diversity of the proteins regulating muscular contraction. Int. Rev. Cytol. 44, 55-92.

Lehman, W. (1977) Calcium ion-dependent myosin from decapod-crustacean muscles. Biochem. J. 163, 291-296.

Lehman, W. (1978) Thick-filament-linked calcium regulation in vertebrate striated muscle. Nature 274, 80-81.

Lehman, W. (1982) The location of a troponin-T-like protein in the myofibril of the horseshoe crab *Limulus polyphemus*. J. Mol. Biol. 154, 385-391.

Lehman, W., Bullard, B. & Hammond, K. (1974) Calcium-dependent myosin from insect flight muscles. J. Gen. Physiol. 63, 553-563.

Lehman, W., Kendrick-Jones, J. & Szent-Györgyi, A.G. (1972) Myosin-linked regulatory systems: comparative studies. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 319-330.

Lehman, W. & Szent-Györgyi, A.G. (1972) Activation of the Adenosine Triphosphatase of *Limulus polyphemus* actomyosin by tropomyosin. J. Gen. Physiol. 59, 375-387.

Lehman, W. & Szent-Györgyi, A.G. (1975) Regulation of muscular contraction, distribution of actin control and myosin control in the animal kingdom. J. Gen. Physiol. 66, 1-30.

Lehrer, S.S. (1975) Intramolecular crosslinking of tropomyosin via disulfide bond formation: evidence for chain register. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 72, 3377-3381.

Lehrer, S.S. (1978) Effects on an interchain disulfide bond on tropomyosin structure: intrinsic fluorescence and circular dichroism studies. J. Mol. Biol. 118, 209-226.

Lehrer, S.S., Graceffa, P. & Betteridge, D. (1981) Conformational dynamics of tropomyosin in solution: evidence for two conformational states. Ann. New York Acad. Sci. 366, 285-299.

Lowry, O.H., Rosebrough, N.J., Farr, A.L. & Randall, R.J. (1951) Protein measurement with the folin phenol reagent. J. Biol. Chem. 193, 265-275.

Mak, A.S., Smillie, L.B. & Stewart, G.R. (1980) A comparison of the amino acid sequence of rabbit skeletal muscle α- and β-tropomyosins. J. Biol. Chem. 255, 3647-3655.

Mannherz, H.G. & Goody, R.S. (1976) Proteins of contractile systems. Annu. Rev. Biochem. 45, 427-465.

Margossian, S.S. & Lowey, S. (1973) Substructure of the myosin molecule. IV. Interactions of myosin and its subfragments with Adenosine Triphosphate and F-actin. J. Mol. Biol. 74, 313-330.

Marston, S.B., Trevett, R.M. & Walters, M. (1980) Calcium ion-regulated thin filaments from vascular smooth muscle. Biochem. J. 185, 355-365.

Mikawa, T. (1979) 'Freezing' of Ca-regulated conformation of reconstituted thin filament of skeletal muscle by glutaraldehyde. Nature 278, 473-474.

Mikawa, T., Takeda, S., Shimizu, T. & Kitaura, T. (1981) Gene expression of myofibrillar proteins in single muscle fibers of adult chicken: micro two dimensional gel electrophoretic analysis. J. Biochem. 89, 1951-1962.

Mill, P.J. & Knapp, M.F. (1970) The fine structure of obliquely striated body wall muscles in the earthworm, *Lumbricus terrestris* Linn. J. Cell Sci. 7, 233-261.

Millward, G.R. & Woods, E.F. (1970) Crystals of tropomyosin from various sources. J. Mol. Biol. 52, 585-588.

Mines, G.R. (1913) On functional analysis by the action of electrolytes. J. Physiol., 46, 188.

Murray, J.M., Knox, M.K., Trueblood, C.E. & Weber, A. (1980 a) Do tropomyosin and myosin compete for actin sites in the presence of Ca? FEBS Lett. 114, 169-173.

Murray, J.M., Weber, A. & Wegner, A. (1980 b) Tropomyosin and the various states of the regulated actin filament. In: Muscle Contraction: Its Regulatory Mechanisms, Hrsg. S. Ebashi, K. Maruyama und M. Endo, Springer-Verlag, Berlin, 221-236.

O'Farrell, P.H. (1975) High resolution two-dimensional electrophoresis of proteins. J. Biol. Chem. 250, 4007-4021.

Parry, D.A.D. & Squire, J.M. (1973) Structural role of tropomyosin in muscle regulation: analysis of x-ray diffraction patterns from relaxed and contracting muscles. J. Mol. Biol. 75, 33-55.

Perry, S.V. (1972) Separation and biological activity of the components of inhibitory-factor preparations. Biochem. J. 127, 215.

Perry, S.V. (1979) The regulation of contractile activity in muscle. Biochem. Soc. Trans. 7, 593-617.

Perry, S.V., Cole, H.A., Head, J.F. & Wilson, F.J. (1972) Localization and mode of action of the inhibitory protein component of the troponin complex. Cold Spring Harbor Symp. Quant. Biol. 37, 251-262.

Perry, S.V., Davies, V. & Hayter, D. (1966) 'Natural' tropomyosin and the factor sensitizing actomyosin Adenosine Triphosphatase to Ethylenedioxybis(ethyleneamino)tetraacetic acid. Biochem. J. 99, 1c-2c.

Phillips, G.N., Fillers, J.P. & Cohen, C. (1980) Motions of tropomyosin. Biophys. J. 32, 485-502.

Phillips, G.N., Lattman, Jr.E.E., Cummins, P., Lee, K.Y. & Cohen, C. (1979) Crystal structure and molecular interactions of tropomyosin. Nature 278, 413-417.

Potter, J.D. (1982) Preparation of troponin and its subunits. Methods in Enzymology 85, 241-263.

Potter, J.D. & Gergely, J. (1974) Troponin, tropomyosin and actin interactions in the Ca regulation of muscle contraction. Biochemistry 13, 2697-2703.

Potter, J.D. & Gergely, J. (1975) The Calcium and Magnesium binding sites on troponin and their role in the regulation of myofibrillar Adenosine Triphosphatase. J. Biol. Chem. 250, 4628-4633.

Potter, J.D. & Johnson, J.D. (1982) Troponin. In: Calcium and Cell Function, Vol. II, Molecular Biology: An International Series of Monographs and Textbooks, Hrsg. W.Y. Cheung, Academic Press, New York, 145-173.

Prosser, C.L. & Zimmermann, G.L. (1943) Effects of drugs on the hearts of *Arenicola* and *Lumbricus*. Physiol. Zool. 16, 77-83.

Regenstein, J.M. & Szent-Györgyi, A.G. (1975) Regulatory proteins of lobster striated muscle. Biochem. 14, 917-925.

Reynolds, E.S. (1963) The use of lead citrate at high pH as an electron-opaque stain in electron microscopy. J. Cell Biol. 17, 208-213.

Rosenbluth, J. (1965) Ultrastructural organization of obliquely striated muscle fibers in *Ascaris lumbricoides*. J. Cell Biol. 25, 495-515.

Rosenbluth, J. (1967) Obliquely striated muscle. III. Contraction mechanism of *Ascaris* body muscle. J. Cell Biol. 31, 15-33.

Rosenbluth, J. (1968) Obliquely striated muscle. IV: Sarcoplasmic reticulum, contractile apparatus, and endomysium of the body muscle of a polychaete, *Glycera*, in relation to its speed. J. Cell Biol. 36, 245-259.

Rosenbluth, J. (1972) Obliquely striated muscle. In: The Structure and Function of Muscle, Hrsg. G.H. Bourne. 2nd edn. Academic Press, New York, Vol. 1, 389-420.

Schaub, M.C., Perry, S.V. & Hacker, W. (1972) The regulatory proteins of the myofibril. Characterization and biological activity of the Calcium-sensitizing factor (troponin A). Biochem. J. 126, 237.

Schwalbe, G. (1869) Über den feineren Bau der Muskelfasern wirbelloser Tiere. Arch. f. mikroskop. Anat. 5, 205-247.

Small, J.V. (1974) Contractile units in vertebrate smooth muscle cells. Nature 249, 324-327.

Small, J.V. (1977) Studies on isolated smooth muscle cells: The contractile apparatus. J. Cell Sci. 24, 327-349.

Small, J.V. & Sobieszek, A. (1980) The contractile apparatus of smooth muscle. Int. Rev. Cytol. 64, 241-306.

Smillie, L.B., Côté, G.P., Lewis, W.G., Mak, A.S., Pato, M.D. & Pearlstone, J.R. (1981) Muscle and non-muscle tropomyosins: structure and interactions with actin and troponin. In: Structural Aspects of Recognition and Assembly in Biological Macromolecules. Hersg. M. Balaban, ISS, Rehovot and Philidelphia, 341-344.

Smillie, L.B., Pato, M.D., Pearlstone, J.R. & Mak, A.S. (1980) Periodicity of α-helical potential in tropomyosin sequence correlates with alternating actin binding sites. J. Mol. Biol. 136, 199-202.

Sobieszek, A. (1982) Steady-state kinetic studies on the actin activation of skeletal muscle heavy meromyosin subfragments. Effects of skeletal, smooth and non-muscle tropomyosins. J. Mol. Biol. 157, 275-286.

Sobieszek, A. & Small, J.V. (1981) Effect of muscle and non-muscle tropomyosins in reconstituted skeletal muscle actomyosin. Eur. J. Biochem. 118, 533-539.

Sobieszek, A. & Bremel, R.D. (1975) Preparation and properties of vertebrate smooth-muscle myofibrils and actomyosin. Eur. J. Biochem. 55, 49-60.

Sobieszek, A. & Small, J.V. (1977) Regulation of the actin-myosin interaction in vertebrate smooth muscle: activation via a myosin light-chain kinase and the effect of tropomyosin. J. Mol. Biol. 112, 559-576.

Spudich, J.A. & Watt, S. (1971) The regulation of rabbit skeletal muscle contraction. I. Biochemical studies of the interaction of the tropomyosin-troponin complex with actin and the proteolytic fragments of myosin. J. Biol. Chem. 246, 4866-4871.

Szent-Györgyi, A.G. (1951) Chemistry of muscular contraction. 2nd edn., Academic Press, New York.

Szent-Györgyi, A.G., Cohen, C. & Kendrick-Jones, J. (1971) Paramyosin and the filaments of molluscan 'catch' muscles. II. Native filaments: isolation and characterization. J. Mol. Biol. 56, 239-258.

Szent-Györgyi, A.G., Szentkiralyi, E.M. & Kendrick-Jones, J. (1973) The light chains of scallop myosin as regualatory subunits. J. Mol. Biol. 74, 179-203.

Taylor, K.A. & Amos, L.A. (1981) A new model for the geometry of the binding of myosin cross-bridges to muscle thin filaments. Biophys. J. 33, 84a.

Towbin, H., Staehelin, T. & Gordon, J. (1979) Electrophoretic transfer of proteins from polyacrylamide gels to nitrocellulose sheets: procedure and some applications. Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A. 76, 4350-4354.

Tsao, T.C., Kung, T.H., Peng, C.M. Chang, Y.S. & Tsou, Y.S. (1965) Electron microscopical studies of tropomyosin and paramyosin. Scientia Sinica 14, 91-111.

Tsuchiya, T., Head, J.F. & Lehman, W. (1982) The isolation of a troponin-C-like protein from the mantle muscle of the squid *Loligo pealei*. Comp. Biochem. Physiol. 71, 507-509.

Vibert, P.J., Haselgrove, J.C., Lowy, J. & Poulsen, F.R. (1972) Structural changes in actin-containing filaments of muscle. J. Mol. Biol. 71, 757-767.

Waisman, D.M., Stevens, F.C. & Wang, J.H. (1978) Purification and characterization of a Ca-binding protein in *Lumbricus terrestris*. J. Biol. Chem. 253, 1106-1113.

Watanabe, S. (1955) Relaxing effects of EDTA on glycerol treated muscle fibers. Arch. Biochem. Biophys. 54, 559-562.

Weber, A. (1969) Parallel response of myofibrillar contraction and relaxation to four different nucleoside triphosphates. J. Gen. Physiol. 53, 781-791.

Weber, A. & Herz, R. (1963) The binding of Calcium to actomyosin systems in relation to their biological activity. J. Biol. Chem. 238, 599-605.

Weber, A. & Murray, J.M. (1973) Molecular control mechanisms in muscular contraction. Physiol. Rev. 53, 612-673.

Weber, K. & Osborn, M. (1969) The reliability of molecular weight determination by dodecylsulfate-polyacrylamide gel electrophoresis. J. Biol. Chem. 224, 4406-4412.

Weeds, A.G. & Taylor, R.S. (1975) Separation of subfragment-1 isoenzymes from rabbit skeletal muscle myosin. Nature 257, 54-56.

Wilkinson, J.M. (1974) The preparation and properties of the components of troponin B. Biochim. Biophys. Acta 359, 379-388.

Woods, E.F. & Pont, M.J. (1971) Characterization of some invertebrate tropomyosins. Biochemistry 10, 270-276.

Yang, Y.Z., Gordon, D.J., Korn, E.D. & Eisenberg, E. (1977) Interaction between *Acanthamoeba* actin and rabbit skeletal muscle tropomyosin. J. Biol. Chem. 252, 3374-3378.

Danksagung

Herrn Prof. Dr. W. Peters danke ich für die Vergabe des Themas, für die Bereitstellung des Arbeitsplatzes und für stete Gesprächsbereitschaft.

Herrn Priv. Doz. Dr. J. D'Haese danke ich für wertvolle Anregungen und kritische Diskussionsbeiträge.

Für die Ausführung der Schreibarbeiten danke ich Frau Wilhelmine Pflugbeil.

Weiterhin gilt mein Dank der Firma Bayer für großzügige Unterstützung bei der Literaturbeschaffung.

Lebenslauf

- Geburt am 4. April 1952 in Remscheid als zweite Tochter des kaufmännischen Angestellten Peter Meyers und der Regierungsrätin Luise Meyers, geb. Freund
- 1953 Umzug der Familie nach Düsseldorf
- ab Ostern 1958 Besuch der Volksschule an der Zitadellstraße in Düsseldorf
- ab Ostern 1962 Besuch der Luisenschule II in Düsseldorf (städt. alt- und neusprachl. Gymnasium)
- Dezember 1963 Scheidung der Eltern
- 1966 Schulwechsel zum Gerresheimer Mädchengymnasium in Düsseldorf
- dort am 4. Juni 1970 das Abitur bestanden
- Herbst 1970 Immatrikulation an der Pädagogischen Hochschule Neuß
- dort im November 1973 die Erste Staatsprüfung für das Lehramt an der Grund- und Hauptschule abgelegt
- Herbst 1973 Immatrikulation an der Technischen Hochschule Aachen für das Fach Biologie (Studienziel Diplom)
- dort im März 1976 die Diplom-Vorprüfung abgelegt
- August 1976 Eheschließung mit dem Diplom-Chemiker Dr. Klaus Ditgens und Umzug nach Wuppertal
- Herbst 1976 Immatrikulation an der Universität Düsseldorf für das Fach Biologie (Studienziel Diplom)
- dort am 8. Oktober 1979 die Diplom-Hauptprüfung abgelegt